



Universidad de Oviedo
Departamento de Biología Funcional
Área de Microbiología

**Virulencia, resistencia y elementos genéticos
móviles en serotipos no prevalentes de
*Salmonella enterica***

Memoria presentada por *Noelia Martínez Álvarez*
para optar al grado de *Doctor por la Universidad de Oviedo*

Septiembre-2007

Agradecimientos

Deseo expresar mi agradecimiento:

De manera muy especial a las Dras. M^a del Carmen Mendoza y M^a del Rosario Rodicio, bajo cuya dirección se ha realizado este trabajo, por sus enseñanzas, su paciencia, la confianza depositada en mí, por haberme dado la oportunidad de iniciar mi formación en el campo de la investigación y por poder contar con su cariño.

A Marián, por convencerme, hace ya tantos años, de seguirle la pista a la alarma epidemiológica para Salmonella serotipo Ohio declarada por el Centro Nacional de Microbiología. Lo cual al final me ha llevado poco a poco hasta el momento de presentar esta tesis. Y sobretodo por el cariño que siempre me ha demostrado.

Al Laboratorio de Salud Pública del Principado de Asturias por cedernos amablemente las cepas analizadas en este trabajo. Especialmente a Marga por la colaboración prestada.

A mis compañeros del ayer: a Anabel y Bea G., mis dos maestras, por sus enseñanzas, sin las cuales no estaría ahora mismo aquí, su apoyo y colaboración, la paciencia demostrada y los buenos ratos compartidos; a Elena, Sara, Aurora, Ana H. y Jessica, por prestarme su ayuda en todo momento; a mis chicos del laboratorio B, Bea, Lucia, Ara y Pablo, por tantos cafés, charlas y risas dentro y fuera del laboratorio; a Ana y Juantxo, por compartir mis pequeñas crisis científicas y no científicas. Y muy especialmente a Irene, por ser simplemente tal como es, sin cuya colaboración no habría podido llegar hasta aquí.

Al resto de los compañeros del Departamento de Microbiología que me han ofrecido su ayuda en múltiples ocasiones.

A mis compañeros de hoy: a Mari Cruz, María, Víctor, Bea del Río, Alfonso y Dani, por las bromas compartidas, acogerme desde el principio como una más del grupo, permitirme seguir aprendiendo y, como no, por los consejos técnicos brindados en la última etapa de mi tesis. Muy especialmente a Miguel por la confianza depositada en mí, permitiéndome seguir trabajando en este campo que resulta a veces tan duro y sobretodo por apoyarme en la finalización de este trabajo.

Al resto de mis compañeros del Instituto de Productos Lácteos de Asturias que siempre me han ofrecido una mano cuando fue necesario y con los que tan divertidas sobremesas he disfrutado.

A mis padres, por ser mi mayor apoyo, sin los cuales esta tesis no sería posible. A mi abuela, por seguir aguantándome, aunque nunca estemos de acuerdo. A mi hermana y mi cuñado, por su cariño y por poder siempre contar con ellos.

A David...por ser tú.

A todos simplemente gracias.

El presente trabajo ha sido financiado gracias a los proyectos del Fondo de Investigación Sanitaria (FISS), 98-0296; 00-1084; 02-0172; 05-2489, y la Fundación para el Fomento en Asturias de la Investigación Científica Aplicada y la Tecnología (FICYT), PC-SAL 98-02.

*En los momentos de crisis, sólo la imaginación es
más importante que el conocimiento.*

(Albert Einstein)

A mis padres

Índice

<i>ABREVIATURAS</i>	<i>xi</i>
<i>RESUMEN</i>	<i>xiii</i>
<i>INTRODUCCIÓN</i>	1
1 EL GÉNERO <i>SALMONELLA</i>: CLASIFICACIÓN Y CARACTERÍSTICAS GENERALES	1
2 SEROTIPOS DE <i>SALMONELLA</i>	2
3 CUADROS CLÍNICOS	6
3.a Infecciones intestinales	6
3.b Septicemia con o sin infección focal	8
3.c Fiebres entéricas	9
3.d Estado de Portador	10
4 PATOGENICIDAD	10
4.a Fimbrias	11
4.b Islas de patogenicidad	12
4.c Islotes de patogenicidad y genes sueltos	18
4.d Plásmidos de virulencia	18
5 RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS	19
5.a Bases bioquímicas y de la resistencia en <i>S. enterica</i> . Genes implicados	20
5.a.1 Resistencia mediada por enzimas modificadores	20
5.a.2 Expulsión activa del antibiótico fuera de la bacteria	22
5.a.3 Resistencia por síntesis de enzimas alternativos o modificación de la diana celular	23
5.b Elementos genéticos implicados en la dispersión de la resistencia	24
5.b.1 Integrones	24
5.b.2 Transposones	26
5.b.3 Plásmidos	29
5.b.4 La isla genómica 1	30
6 EPIDEMIOLOGIA	30
7 TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN	33

OBJETIVOS	37
MATERIAL Y METODOS	39
1 AISLAMIENTOS DE <i>SALMONELLA</i>. PROCEDENCIA Y CULTIVO	39
2 ANÁLISIS FENOTÍPICO DE LA SENSIBILIDAD-RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS	40
3 ANÁLISIS GENOTÍPICOS	41
3.a Métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	41
3.a.1. Protocolo de la amplificación mediante PCR	41
3.a.2. Variantes de la amplificación mediante PCR	43
3.a.3 PCR-RFLP	44
3.b Macrorrestricción con <i>Xba</i> I y <i>Bln</i> I y electroforesis en campo pulsante	45
3.c Análisis de plásmidos	47
3.c.1 Extracción y visualización	47
3.c.2 Conjugación	47
3.c.3 Transformación	48
3.d Detección de secuencias de ADN por hibridación	48
3.e Secuenciación del ADN	50
RESULTADOS	51
<i>I Epidemiología molecular de <u>Salmonella enterica</u> serotipo Hadar en el Principado de Asturias</i>	
<i>I.1. DATOS EPIDEMIOLÓGICOS</i>	51
<i>I.2. TIPIFICACIÓN MEDIANTE MÉTODOS GENOTÍPICOS</i>	52
I.2.a RAPD	52
I.2.b Macrorrestricción-PFGE	53
<i>I.3. RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS</i>	55
<i>I.4. GENES Y ELEMENTOS GENÉTICOS IMPLICADOS EN LA RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS</i>	56
I.4.a Identificación de determinantes de resistencia a antimicrobianos	56
I.4.b Análisis de integrones y plásmidos	57

I.4.c Localización de determinantes de resistencia en los perfiles de macrorrestricción-PFGE	59
--	----

II Epidemiología molecular de Salmonella enterica serotipo Brandenburg en el Principado de Asturias

II.1. DATOS EPIDEMIOLÓGICOS	63
II.2. TIPIFICACIÓN MEDIANTE MÉTODOS GENOTÍPICOS	64
II.2.a RAPD	64
II.2.b Macrorrestricción-PFGE	65
II.3. RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS	67
II.4. GENES Y ELEMENTOS GENÉTICOS IMPLICADOS EN LA RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS	68
II.4.a Identificación de determinantes de resistencia a antimicrobianos	68
II.4.b Detección de integrones y transposones	69
II.4.c Análisis de plásmidos-R	70
II.4.d Estructura del integrón In-Sb y de los transposones detectados en plásmidos conjugativos de <i>S. Brandenburg</i>	71

III Epidemiología molecular de Salmonella enterica serotipo Ohio en el Principado de Asturias

III.1. DATOS EPIDEMIOLÓGICOS	79
III.2. TIPIFICACIÓN MEDIANTE MÉTODOS GENOTÍPICOS	80
III.2.a RAPD	80
III.2.b Macrorrestricción-PFGE	81
III.3. RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS	83
III.4. GENES Y ELEMENTOS GENÉTICOS IMPLICADOS EN LA RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS	84
III.4.a Identificación de determinantes de resistencia a antimicrobianos	84
III.4.b Detección de integrones y transposones	84
III.4.c Análisis de plásmidos	85
III.4.d Estructura del integrón de los transposones de tipo Tn21 y Tn9	86

IV Perfiles de genes de Virulencia en aislamientos de los serotipos Hadar,

Brandenburg y Ohio

<i>IV.1. GENES ASOCIADOS A ISLAS DE PATOGENICIDAD</i>	93
<i>IV.2. GENES NO ASOCIADOS A ISLAS DE PATOGENICIDAD</i>	97
IV.2.a Plásmido de virulencia	97
IV.2.b Islotes de virulencia y genes sueltos	98
<i>IV.3. ASIGNACIÓN DE CEPAS A PERFILES DE VIRULENCIA</i>	99
<i>DISCUSIÓN</i>	101
<i>1 IMPACTO EPIDEMIOLÓGICO</i>	101
<i>2 ASIGNACIÓN DE AISLAMIENTOS A TIPOS GENÓMICOS</i>	104
<i>3 EL PROBLEMA DE LA RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS EN LOS SEROTIPOS DE <i>SALMONELLA</i> BAJO ESTUDIO</i>	108
<i>4 ELEMENTOS GENÉTICOS MÓVILES IMPLICADOS EN LA RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS EN LOS SEROTIPOS DE <i>SALMONELLA</i> BAJO ESTUDIO</i>	113
<i>5 APORTACIONES DE LAS DIFERENCIAS EN LOS PERFILES DE GENES DE VIRULENCIA EN <i>SALMONELLA</i></i>	118
<i>CONCLUSIONES</i>	121
<i>BIBLIOGRAFÍA</i>	123
<i>ANEXOS</i>	145

FIGURAS

Figura 1. <i>Salmonella sp.</i>	1
Figura 2. Medios diferenciales para el aislamiento de <i>Salmonella sp.</i>	2
Figura 3. Pared celular de una bacteria Gram negativa	4
Figura 4. Representación esquemática de la variación de fase de los flagelos en <i>Salmonella</i>	5
Figura 5. Inducción de enfermedad intestinal por <i>S. enterica</i>	7
Figura 6. Localización de factores de virulencia representativos de <i>S. enterica</i>	11
Figura 7. Representación de la SPI1 en <i>S. enterica</i>	13
Figura 8. Actuación de SST3 codificados por IP 1 y 2 de <i>S. enterica</i>	14
Figura 9. Representación de SPI2 de <i>S. enterica</i>	15
Figura 10. Representación de la SPI3 en <i>S. enterica</i>	16
Figura 11. Representación de la SPI5 en <i>S. enterica</i>	17
Figura 12. Mapa genético de los plásmidos de virulencia de <i>S. enterica</i>	19
Figura 13. Inserción de casetas génicas en integrones	24
Figura 14. Esquema de un integrón de clase 1	25
Figura 15. Esquema del transposón Tn10	27
Figura 16. Esquema del transposón Tn21	28
Figura 17. Representación esquemática del plásmido NR1 conjugativo, prototipo de plásmido de resistencia	29
Figura 18. Distribución mundial de serotipos de <i>Salmonella</i> aislados en humanos durante el período 2000-2004	31
Figura 19. Antibiograma según el método de difusión disco-placa	40
Figura 20. Etapas de la amplificación basada en la PCR	42
Figura 21. Pasos básicos del protocolo de PCR.	43
Figura 22. Esquema de la electroforesis en campo pulsante (PFGE)	46

Figura 23. Transferencia de ADN a membranas (“Southern-blot”) e hibridación	49
Figura 24. Tipificación RAPD de los aislamientos de <i>S. Hadar</i>	52
Figura 25. Perfiles generados mediante <i>XbaI</i> -PFGE a partir de los aislamientos de <i>S. Hadar</i>	53
Figura 26. Perfiles <i>BlnI</i> -PFGE a partir de <i>S. Hadar</i> y dendograma de similitud basado en los perfiles <i>BlnI</i> -PFGE	54
Figura 27. Análisis de plásmidos de aislamientos representativos de <i>S. Hadar</i>	57
Figura 28. Localización de determinantes de resistencia en el genoma de <i>S. Hadar</i>	60
Figura 29. Perfiles obtenidos mediante tipificación RAPD en <i>S. Brandenburg</i>	64
Figura 30. Perfiles <i>XbaI</i> -PFGE generados a partir de los aislamientos de <i>S. Brandenburg</i> y dendograma de similitud construido a partir de los perfiles <i>XbaI</i> -PFGE	65
Figura 31. Perfiles <i>BlnI</i> -PFGE de los aislamientos de <i>S. Brandenburg</i> y dendograma de similitud basado en los perfiles <i>BlnI</i> -PFGE	66
Figura 32. Análisis plasmídico de aislamientos representativos de <i>S. Brandenburg</i> y sus transconjugantes	71
Figura 33. Organización de In- <i>Sb1</i> ::Tn21::Tn9 y Tn1721 en aislamientos de <i>S. Brandenburg</i>	73
Figura 34. Organización de In- <i>Sb2</i> ::Tn21::Tn9 y Tn10 en aislamientos de <i>S. Brandenburg</i>	74
Figura 35. Tipificación RAPD de los aislamientos de <i>S. Ohio</i>	80
Figura 36. Perfiles generados por <i>XbaI</i> -PFGE a partir de <i>S. Ohio</i> y dendograma de similitud basado en los perfiles <i>XbaI</i> -PFGE	81
Figura 37. Perfiles <i>BlnI</i> -PFGE generados por los aislamientos de <i>S. Ohio</i> y dendograma de similitud derivado de la comparación de los perfiles <i>BlnI</i> -PFGE	82
Figura 38. Detección de plásmidos-R en aislamientos de <i>S. Ohio</i> e hibridación con la RV del integrón de clase 1	86
Figura 39. Organización de In- <i>So1</i> ::Tn21 y Tn10 en <i>S. Ohio</i>	88
Figura 40. Representación esquemática de SPI1 donde se indican las regiones amplificadas y amplicones <i>orgA</i> e <i>invE/A</i> obtenidos	93

Figura 41. Representación esquemática de SPI2, se indican las regiones amplificadas, y amplicones <i>ssaQ</i> y <i>ttrC</i>	94
Figura 42. Representación esquemática de los genes de SPI3 amplificados y amplicones <i>sugR</i> , <i>rhuM</i> , <i>rmbA</i> , <i>misL</i> y <i>mgtC</i>	95
Figura 43. Comparación de la secuencia de nucleótidos (5'→3') del amplicón <i>sugR</i> de <i>S. Ohio</i> con la secuencia del gen <i>sugR</i> de <i>S. Typhimurium</i>	96
Figura 44. Amplicones <i>spi4D</i> y <i>spi4R</i>	96
Figura 45. Representación de los genes de SPI5 amplificados y amplicones <i>sopB</i> y <i>pipA</i>	97
Figura 46. Amplificación de los genes de virulencia sueltos	98
Figura 47. Distribución epidemiológica de los aislamientos de <i>S. Hadar</i> , <i>S. Brandenburg</i> y <i>S. Ohio</i> recuperados en el Principado de Asturias durante el período 1995-2004	102
Figura 48. Evolución de los integrones de clase 1 a partir de un transposón de tipo Tn402 y los transposones de la subfamilia Tn21 incluyendo en el esquema los detectados en esta tesis para <i>S. Brandenburg</i> y <i>S. Ohio</i>	115
Figura 49. Deleción genómica por recombinación entre secuencias repetidas directas	119

TABLAS

Tabla 1. Fórmula antigénica de algunos serogrupos y serotipos de <i>S. enterica</i>	3
Tabla 2. Antimicrobianos y categorías de sensibilidad-resistencia	40
Tabla 3. Reactivos y concentraciones utilizados en la PCR	41
Tabla 4. Condiciones de la reacción de amplificación	44
Tabla 5. Dispersión espacial y temporal de los aislamientos de <i>S. Hadar</i> en el Principado de Asturias (1995-2004)	51
Tabla 6. Correlación de perfiles RAPD y PFGE en <i>S. Hadar</i>	55
Tabla 7. Características de los plásmidos de resistencia detectados en <i>S. Hadar</i>	58
Tabla 8. Perfiles de resistencia a antimicrobianos encontrados en aislamientos de <i>S. Hadar</i> . Distribución en perfiles de macrorrestricción-PFGE, contenido de plásmidos-R y localización de determinantes-R en el genoma bacteriano	61
Tabla 9. Dispersión espacial y temporal de los aislamientos de <i>S. Brandenburg</i> en el Principado de Asturias (1993-2005)	63
Tabla 10. Correlación de perfiles RAPD y PFGE en <i>S. Brandenburg</i>	67
Tabla 11. Características de los plásmidos de resistencia detectados en <i>S. Brandenburg</i>	70
Tabla 12. Características relevantes de los aislamientos de <i>S. Brandenburg</i> analizados	76
Tabla 13. Dispersión espacial y temporal de los aislamientos de <i>S. Ohio</i> en el Principado de Asturias (1991-2005)	79
Tabla 14. Correlación de perfiles RAPD y PFGE en <i>S. Ohio</i>	83
Tabla 15. Características de los plásmidos de resistencia detectados en <i>S. Ohio</i>	86
Tabla 16. Características relevantes de los aislamientos de <i>S. Ohio</i> analizados	90
Tabla 17. Genes localizados en islas de virulencia analizados	93
Tabla 18. Perfiles de virulencia de los serotipos estudiados	100
Tabla I.a. Serotipo Hadar	145
Tabla I.b. Serotipo Brandenburg	147

Tabla I.c. Serotipo Ohio	148
Tabla II.a. Genes de resistencia a antimicrobianos	150
Tabla II.b. Integrones y transposones	151
Tabla II.c. Genes de virulencia	153
Tabla II.d. Amplificación de secuencias aleatorias	154
Tabla III.a. Transposón <i>Tn10</i>	155
Tabla III.b. Transposón <i>Tn1721</i>	155
Tabla III.c. Transposón <i>Tn21</i>	156
Tabla III.d. Transposón <i>Tn9</i> y unión al <i>Tn21</i> (<i>Tn2670</i>)	156

Abreviaturas

AMP: Ampicilina
ATCC: “American Type Culture Collection”
a_w: Actividad del agua
BES: Boletín Epidemiológico Semanal
BF: Brote Familiar
CA: Caso Aislado
CEF: Cefalotina
CHL: Cloranfenicol
CIP: Ciprofloxacino
CLSI: Clinical and Laboratory Standards
Institute
CMI: Concentración Mínima Inhibitoria
CNM: Centro Nacional de Microbiología
CR: Región Común
DA: Diarrea Aguda
DR: Diarrea Recurrente
EGM: Elementos Genéticos Móviles
EH: Agar Entérico Hektoen
EMB: Eosina-azul de metileno
ESBL: β-lactamasas de espectro ampliado
GEN: Gentamicina
H: Antígeno flagelar
HUCA: Hospital Universitario Central de
Asturias
IL: Interleucina
IFN-γ: Interferón γ
IR: Repeticiones Invertidas
IS: Secuencias de Inserción
ISCHIII: Instituto de Salud Carlos III
KAN: Kanamicina
LA: Agar Luria-Bertani
LB: Caldo Luria-Bertani
Lpf: “Long polar fimbria”
LNRSSSE: Laboratorio Nacional de
Rreferencia de Salmonella y Shigella
LPS: Lipopolisacárido
LSP: Laboratorio de Salud Pública
MDR: “Multidrug-Resistant”
MH: Agar Mueller Hinton
MPI: Isla Mayor de Patogenicidad
NAL: Ácido Nalidíxico
O: Antígeno somático
OMS: Organización Mundial de la Salud
ORF: Pauta abierta de lectura
PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa
PFGE: “Pulsed Field Gel Electrophoresis”
PMN: Células polimorfonucleadas
R: Resistencia
RAPD: “Random Amplified Polymorphic
DNA”
RFLPs: “Restriction Fragment Lenght
Polymorphisms”
RI: Integrones de Resistencia
RV: Región Variable
S: Coeficiente de Similitud.
SI: Superintegrones
SIF: “Salmonella Induced Filaments”
SGII: Isla Genómica 1 de Salmonella
SPI: Isla de Patogenicidad de Salmonella
spv: “Salmonella plasmid virulence”
SST3: Sistema de Secreción Tipo 3
STR: Estreptomina
SUL: Sulfadiacina
SVC: Vacuolas que Contienen Salmonella
SXT: Trimetoprim-sulfametoxazol
UCG: Unidades de Captura Génica

Tafi: “Thin aggregative fimbria”

TET: Tetraciclina

TG: Tipo Genético

TLR: “Toll-Like Receptor”

Tm: Temperatura de anillamiento

TMP: Trimetoprim

V: Virulencia

Vi: Antígeno capsular

Resumen

Las salmonelas no-tifoideas que causan actualmente infecciones en seres humanos son frecuentemente epidémicas y resistentes a los antimicrobianos (R), además de virulentas (V). La evolución de las bacterias en cuanto a la adquisición de determinantes-V y/o -R se debe, fundamentalmente, a la incorporación, a menudo secuencial, de piezas de ADN, cuya combinación origina nuevos elementos genéticos, que quedan inmediatamente sometidos a la selección natural en un ambiente cambiante. Los genes-V y -R pueden estar aislados, formando pequeñas agrupaciones (islotos) y/o en agrupaciones mayores (islas genómicas o de patogenicidad) y pueden ser de localización cromosómica o plasmídica. Los genes-R, una vez seleccionados, pueden mantenerse en las bacterias originarias y su descendencia o bien diseminarse entre bacterias más o menos relacionadas a través de los elementos genéticos móviles (EGMs) entre los que destacan el sistema integrón-casete génica, los transposones, los plásmidos y las islas genómicas de resistencia.

En la presente tesis se llevaron a cabo estudios de epidemiología molecular en 176 aislamientos de *Salmonella enterica* pertenecientes a tres serotipos no prevalentes, aunque causantes de alertas epidemiológicas: Hadar, Brandenburg y Ohio. Se determinó el impacto epidemiológico de los mismos, identificando los tipos endémicos y prevalentes en el Principado de Asturias y su posible presencia en otras áreas geográficas. Los subtipos fueron trazados mediante análisis de macrorrestricción genómica-PFGE y genotipos-R y -V. Como ejemplo tenemos que los subtipos prevalentes de Hadar se pueden considerar endémicos en España y uno de ellos causó un brote nacional asociado a la salsa de pollos asados comerciales en 2005. Los estudios de resistencia revelaron un amplio porcentaje de cepas con resistencia múltiple (RM) y una correlación entre ésta y la presencia de EGMs. En los tres serotipos se identificaron plásmidos-R, de tamaño variable (9-300 Kb) y diferentes genotipos-R, la mayoría de los cuales resultaron conjugativos. En aislamientos con RM de Brandenburg y Ohio, pero no de Hadar, se detectó un integrón de clase 1 (1600/*dfrA1-aadA1*), asociado a transposones de tipo Tn21 y estos, a su vez, a Tn9. En aquellos resistentes a tetraciclina se encontraron transposones de tipo Tn1721 y Tn10, portadores de los genes *tet(A)* y *tet(B)*, respectivamente. Esta es la primera vez que se estudian los perfiles de genes-R en los plásmidos del serotipo Hadar y la organización de los EGMs implicados en la RM en los serotipos Brandenburg y Ohio. La determinación de los perfiles-V reveló pequeñas diferencias intra-serotipo en el caso de Hadar y Brandenburg (presencia/ausencia de *sopE*). Las variaciones inter-serotipo eran mayores: Hadar carecía de los genes *agfA*, *sugR* y *rhuM*, presentes en los otros dos serotipos, mientras que todos los aislamientos de Ohio presentaron un gen *sugR* deletado y fueron negativos para *sopE*. Todos los aislamientos poseían las cinco islas de patogenicidad (SPII-5) identificadas en la cepa tipo *S. Typhimurium* LT2.

Introducción

1. EL GÉNERO SALMONELLA: CLASIFICACIÓN Y CARACTERÍSTICAS GENERALES

El género *Salmonella* se incluye en la Familia *Enterobacteriaceae*, Orden *Enterobacteriales*, Clase γ -*Proteobacteria* (Garrity *et al.*, 2004). Actualmente se aceptan dos especies, *S. enterica* y *S. bongori*. La primera agrupa a las subespecies *enterica* (subsp. I), *arizonae* (subsp. IIIa), *diarizonae* (subsp. IIIb), *houtenae* (subsp. IV), *salamae* (subsp. II) e *indica* (subsp. VI). La subespecie *enterica* se aísla de humanos y de animales de sangre caliente e incluye la mayoría de los aislamientos patógenos de humanos. El resto de subespecies de *S. enterica* así como *S. bongori* se encuentran principalmente en animales de sangre fría y en el ambiente. Esta segunda especie es la más antigua e incluye una única subespecie (subsp. V). Además, de acuerdo con sus características antigénicas, las bacterias del género *Salmonella* se clasifican en serogrupos y serotipos (apartado 2), considerados estos últimos como especies hasta finales del siglo XX.

Se trata de bacilos Gram negativos (Fig. 1A) aero-anaerobios facultativos con un contenido en guanina-citosina (GC) de 50-53%. No producen endosporas. Generalmente son móviles por flagelación peritrica (Fig. 1B), a excepción de los serotipos Gallinarum y Pullorum y variantes inmóviles de otros serotipos.

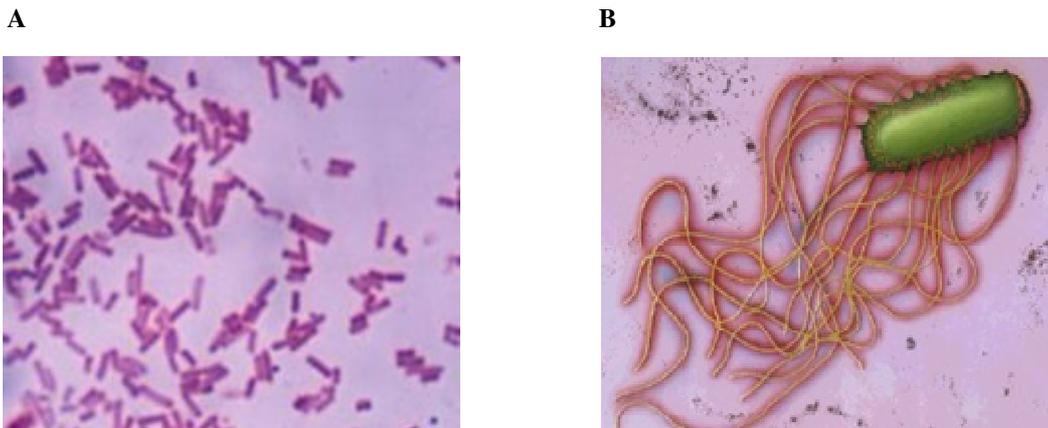


Figura 1. *Salmonella sp.*

(A) Tinción Gram (<http://www.visualsunlimited.com/browse/vu132/vu132592.html>)

(B) Flagelación peritrica. (http://science.nasa.gov/headlines/y2003/01dec_yeast.htm)

La mayoría produce gas por fermentación de carbohidratos, especialmente glucosa, con varias excepciones: serotipos Typhi (cuyo reservorio y hospedador susceptible es el hombre), Gallinarum y Pullorum (cuyo reservorio y hospedador susceptible son las gallináceas) y algunas variantes mutantes de serotipos productores de gas entre los que destaca por su frecuencia

relativamente alta el serotipo Dublin (Corral y Perea, 1992). Producen el enzima catalasa y dan negativo en la prueba de la citocromo oxidasa. Reducen los nitratos a nitritos. Toleran altas concentraciones de sales biliares y su crecimiento no resulta inhibido por la presencia de colorantes como el azul de metileno, la eosina, la fucsina ácida, el cristal violeta o el verde brillante. Esta resistencia se emplea para el diseño de medios de cultivo selectivos, como el agar Hektoen (EH), el agar verde brillante o el agar eosina-azul de metileno (EMB). Las altas concentraciones de sales biliares así como los distintos colorantes adicionados a estos medios van a inhibir la flora acompañante permitiendo el crecimiento selectivo. La morfología de las colonias de *Salmonella* en estos medios, al no fermentar la lactosa y producir H₂S, se utilizará como carácter diferencial de género (Fig. 2).

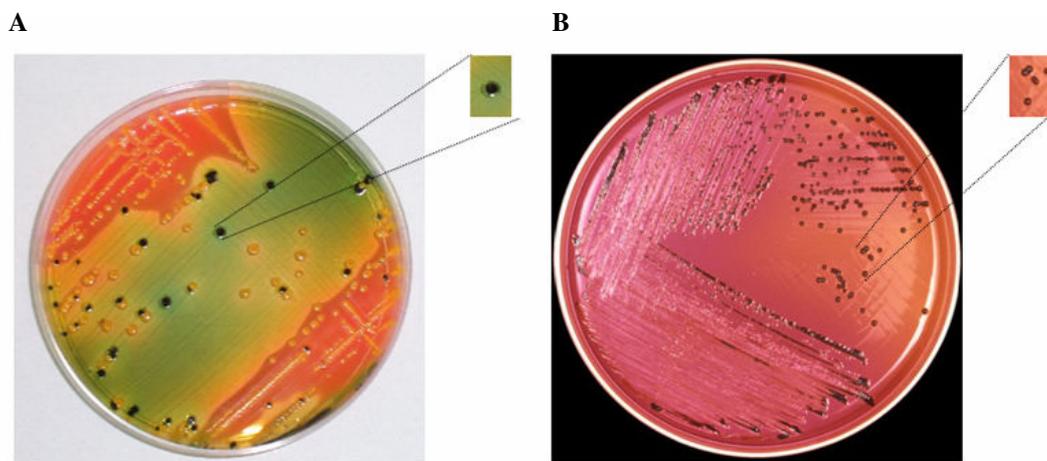


Figura 2. Medios diferenciales para el aislamiento de *Salmonella* sp. Las colonias de este microorganismo presentan un centro negro por producción de H₂S. (A) Agar EH. (B) Agar XLD

Son capaces de crecer en un rango de temperatura que varía desde los cinco a los 45-47°C, siendo la temperatura óptima de 35-37°C. El pH óptimo de crecimiento es de 6,5-7,5, soportando un rango entre 4,5-9. Se desarrollan bien a una actividad de agua (a_w) de 0,945 a 0,999, aunque a valores muy bajos, correspondientes a productos deshidratados, sobreviven largo tiempo. En los alimentos pueden multiplicarse hasta valores de a_w iguales a 0,93. (Gledel, 1995; Mossel *et al.*, 2002).

2. SEROTIPOS DE SALMONELLA

La serotipificación de *Salmonella* se basa en el sistema de Kauffmann-White que, al igual que en otras enterobacterias, utiliza tres tipos de antígenos de superficie: somáticos (O), flagelares (H) y capsulares (K). Por esta vía se han identificado más de 30 serogrupos y más de 2500

serotipos (ver ejemplos relevantes en tabla 1). La gran mayoría pertenecen a *S. enterica*, mientras que *S. bongori* incluye menos de diez, todos ellos poco frecuentes (Reeves *et al.*, 1989).

Tabla 1. Fórmula antigénica de algunos serogrupos y serotipos de *S. enterica* subespecie *enterica*

SEROGRUPOS/serotipos	Antígeno O	Antígeno H	
		Primera fase	Segunda fase
Grupo A (Antígenos 1, 2) Paratyphi A	<u>1</u> , 2, 12	a	(1, 5)
Grupo B (Antígeno 4) Typhimurium	<u>1</u> , 4, (5), 12	i	1, 2
Brandenburg Paratyphi B	4 , (5), 12 <u>1</u> , 4, (5), 12	1, v b	e, n, Z₁₅ 1, 2
Grupo C (Antígeno 6)			
Grupo C₁ Virchow	6, 7, <u>14</u>	r	1, 2
Ohio Infantis	6, 7, 14 6, 7, <u>14</u>	b r	1, w 1, 5
Braenderup	6, 7, <u>14</u>	e, h	e, n, Z ₁₅
Grupo C₂ Hadar	6, 8	z₁₀	e, n, x
Muenchen	6, 8	d	1, 2: (z ₆₇)
Newport	6, 8, <u>20</u>	e, h	1, 2: (z ₆₇)
Grupo D (Antígeno 9)			
Panama	<u>1</u> , 9, 12	1, v	1, 5
Enteritidis	<u>1</u> , 9, 12	g, m	-
Typhi	9, 12 (Vi)	d	-
Grupo E (Antígeno 3)			
London	3, 10 (<u>15</u>)	1, v	1, 6
Grupo G (Antígeno 13)			
Havana	<u>1</u> , 13, 23	f, g, (s)	-

Los antígenos entre paréntesis pueden estar presentes o no y los subrayados dependen de conversión lisogénica

Los serotipos en negrita (Hadar, Brandenburg y Ohio) son objeto de estudio específico en esta tesis

Los **antígenos somáticos (O)** son termoestables y alcohol-resistentes. Forman parte del lipopolisacárido (LPS) sito en la membrana externa de la pared celular y que posee estructuralmente tres zonas (Fig. 3):

- Lípido A, zona más interna y con actividad tóxica intensa (**endotoxina**).
- Polisacárido central o núcleo del polisacárido, formada por varios azúcares, muchos de ellos con estructura poco común.
- Cadena lateral O. Es una cadena heteropolisacáridica, más o menos larga, que se extiende hacia fuera del núcleo. Su composición es altamente variable, constituyendo el **antígeno O**, que proporciona la especificidad.

Existen antígenos O mayores o factores principales que son los que definen el grupo antigénico o serogrupo (por ejemplo todos los serotipos pertenecientes al serogrupo C presentan el

antígeno 6). Los antígenos O menores o factores secundarios, están ligados a un factor principal y no tienen valor discriminatorio. Algunos se originan por cambios químicos de un antígeno mayor, como O: cinco que se produce por la acetilación del polisacárido responsable de la especificidad del O: 4, 12 característico del serogrupo B. Otros se producen por conversión fágica. La inclusión de un fago en una cepa de *Salmonella* del serogrupo C (O: 6, 7), por ejemplo, determina la aparición del factor O: 14 pasando a ser O: 6, 7, 14. Este fenómeno se denomina exteriorización ligada a la presencia de un bacteriófago, tal es el caso del serotipo Ohio (Corral y Perea, 1992; Herrera-León, 2004).

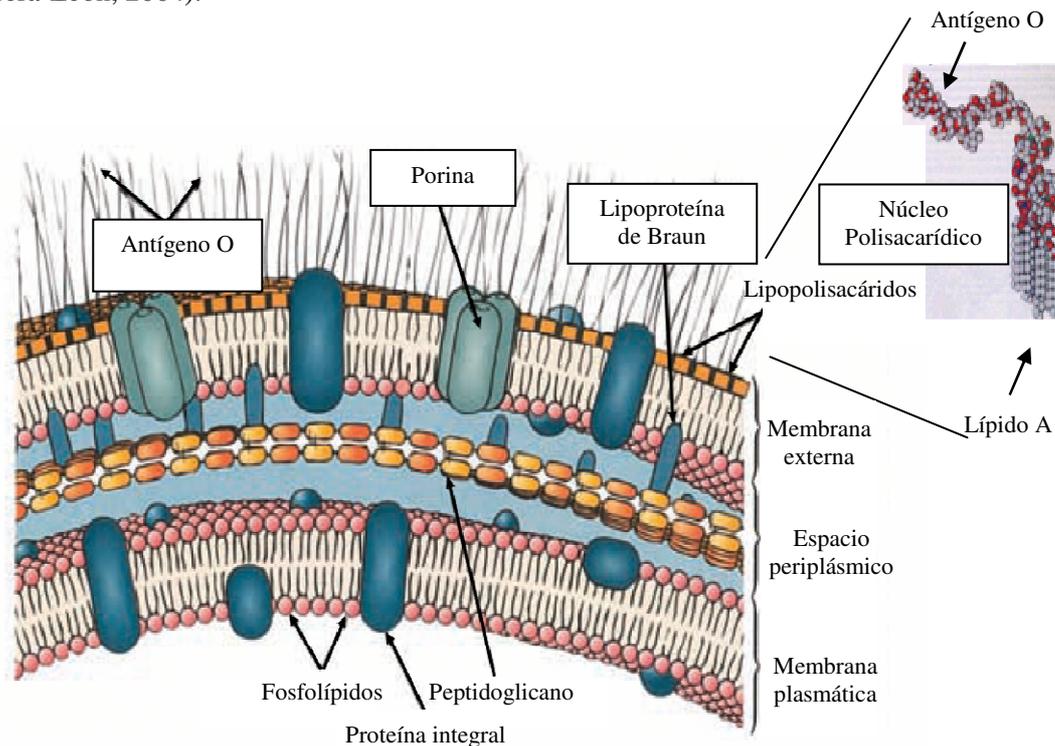


Figura 3. Pared celular de una bacteria Gram negativa (Prescott *et al.*, 2004)

Los **antígenos flagelares o H** son de naturaleza proteica y termolábiles. La flagelina, proteína estructural de los flagelos, es un antígeno importante. Mientras que los extremos terminales COOH y NH₂ están altamente conservados, la región central tiene una gran variabilidad. Esta variación se usa para definir antígenos flagelares, dentro del esquema de Kauffmann-White.

Algunos serotipos de *Salmonella* sólo producen un tipo de antígeno H, son los denominados monofásicos, como Typhi. Sin embargo, la mayoría de los serotipos pueden presentar dos tipos de antígeno H, llamándose bifásicos. En éstos, el antígeno flagelar puede aparecer de forma alternativa en fase 1, llamada también específica y que es característica de cada serotipo o en

fase 2, que es menos específica y puede ser común a varios. Una cepa de *Salmonella* sólo expresa un tipo de antígeno flagelar en un determinado momento.

El sistema está regulado de forma que una recombinasa, codificada por el gen *hin*, cataliza la inversión reversible de un fragmento de 993 pb que contiene el promotor del operón *fljBA*. En un sentido el promotor dirige la transcripción de los genes *fljB* y *fljA*, que codifican para la flagelina de segunda fase y para un represor del gen *fliC* (que codifica la flagelina de primera clase), respectivamente. En este caso se expresará el antígeno H de segunda fase. Cuando el fragmento se invierte, los genes *fljA* y *fljB* no se expresan, la expresión de *fliC* no se reprime y la bacteria produce el antígeno flagelar de primera fase (Fig. 4). La variación de fase, como se conoce a este proceso, proporciona una obvia ventaja a las bacterias. Los organismos de una determinada población que consigan cambiar de fase durante el proceso de infección podrán sobrevivir a la respuesta inmune del hospedador ya que, si éste se encuentra produciendo anticuerpos frente a la flagelina H1, aquellas bacterias que cambien de fase y produzcan flagelina H2 podrán escapar a la acción de los anticuerpos específicos frente a la primera (Corral y Perea, 1992; Relman y Falkow, 1997; Echeita *et al.*, 2002; Herrera-León *et al.*, 2004, 2006).

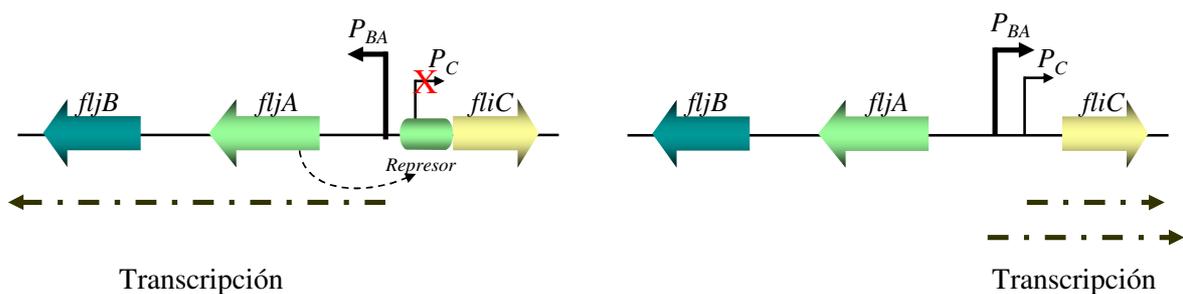


Figura 4. Representación esquemática de la variación de fase de los flagelos en *Salmonella* (Madigan *et al.*, 1998a, con modificaciones)

En cuanto a los **antígenos capsulares o K**, el único que se conoce en *Salmonella* es el antígeno Vi, un polímero lineal del ácido α -1,4 (2-deoxi)-2-N-acetilgalacturónico, que puede estar acetilado en posición C3. Se encuentra en tres serotipos altamente invasivos: Typhi, Paratyphi C y Dublin (Raffatellu *et al.*, 2006).

Salmonella es uno de los patógenos humanos más ubicuos en la naturaleza. Su hábitat primario es el tracto intestinal de los animales, pudiendo encontrarse también en el tracto intestinal de humanos, en alimentos y en el ambiente. Dependiendo del grado de adaptación a un hospedador o ambiente específico se habla de:

Serotipos adaptados al hombre: provocan infecciones en humanos pero rara vez afectan a animales. La infección se produce por heces de personas enfermas o de portadores asintomáticos y los vectores de transmisión son el agua, los alimentos y los insectos. Los representantes son Typhi, Paratyphi A, B y C y Sendai.

Serotipos adaptados a animales: Pullorum y Gallinarum (pollos y gallinas), Abortus-ovis (corderos), Abortus-equi (caballos), Choleraesuis (cerdos) y Dublin (vacas). Estos dos últimos con frecuencia pueden provocar infecciones invasivas en humanos.

Serotipos no adaptados a hospedadores específicos: son la mayoría y se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. En distintas áreas geográficas predominan distintos serotipos.

3. CUADROS CLÍNICOS

Cuando *Salmonella* interacciona con el hospedador se pueden dar tres posibilidades:

1. Eliminación del microorganismo por el sistema inmune.
2. Aparición de un estado de portador asintomático.
3. Desarrollo de enfermedad, con distintas manifestaciones clínicas: infecciones intestinales (enteritis y enterocolitis) e infecciones invasivas. Entre estas últimas se incluyen las fiebres entéricas, infecciones paraintestinales y la septicemia, con o sin infección focal.

3.a. Infecciones intestinales

La manifestación más común de la infección por serotipos no tifoideos de *S. enterica* es la inflamación intestinal aguda, que puede afectar al intestino delgado y/o al grueso (enteritis o enterocolitis). Generalmente, la bacteria penetra en el hospedador vía digestiva, a través de alimentos o agua contaminados. Para la mayoría de los serotipos la dosis infectiva mínima se sitúa alrededor de 10^5 - 10^6 bacterias. Una vez ingeridas, las bacterias alcanzan el estómago donde se enfrentan al jugo gástrico y a un pH muy ácido, lo que reduce el número de microorganismos viables. Aquellos capaces de sobrevivir pasan al intestino, donde deberán resistir los ácidos grasos bactericidas producidos por la microbiota normal del hospedador, la secreción de mucina, la continua eliminación de células epiteliales y el peristaltismo intestinal que evitan la colonización. Además, la monocapa celular del epitelio intestinal supone una barrera física a la entrada de microorganismos e invasión de tejidos más profundos (Pestka *et al.*, 1985).

Las bacterias que escapan a la primera línea de defensas intestinales, colonizan el íleon y/o el colon, e invaden el epitelio. El mecanismo de invasión implica la unión inicial a receptores

específicos de la superficie de la célula hospedadora, seguida por la internalización forzada por la propia bacteria (Wallis y Galyov, 2000). Estudios con animales de experimentación y cultivos celulares indican que *S. enterica* puede penetrar tanto en enterocitos como en células M, células epiteliales especializadas que recubren los nódulos linfáticos de las placas de Peyer del íleon. La invasión depende de la actuación de un sistema de secreción de tipo 3 (SST3), codificado por la isla de patogenicidad SPI1 (apartado 4.b). Además, la actuación de este sistema inicia la liberación, por parte de las células epiteliales, de citoquinas CXC, como la interleucina 8 (IL8), que ejercen una acción quimiotáctica sobre polimorfonucleares neutrófilos (PMN), importantes agentes defensivos de la respuesta inmune inespecífica del hospedador (Tükel *et al.*, 2006).

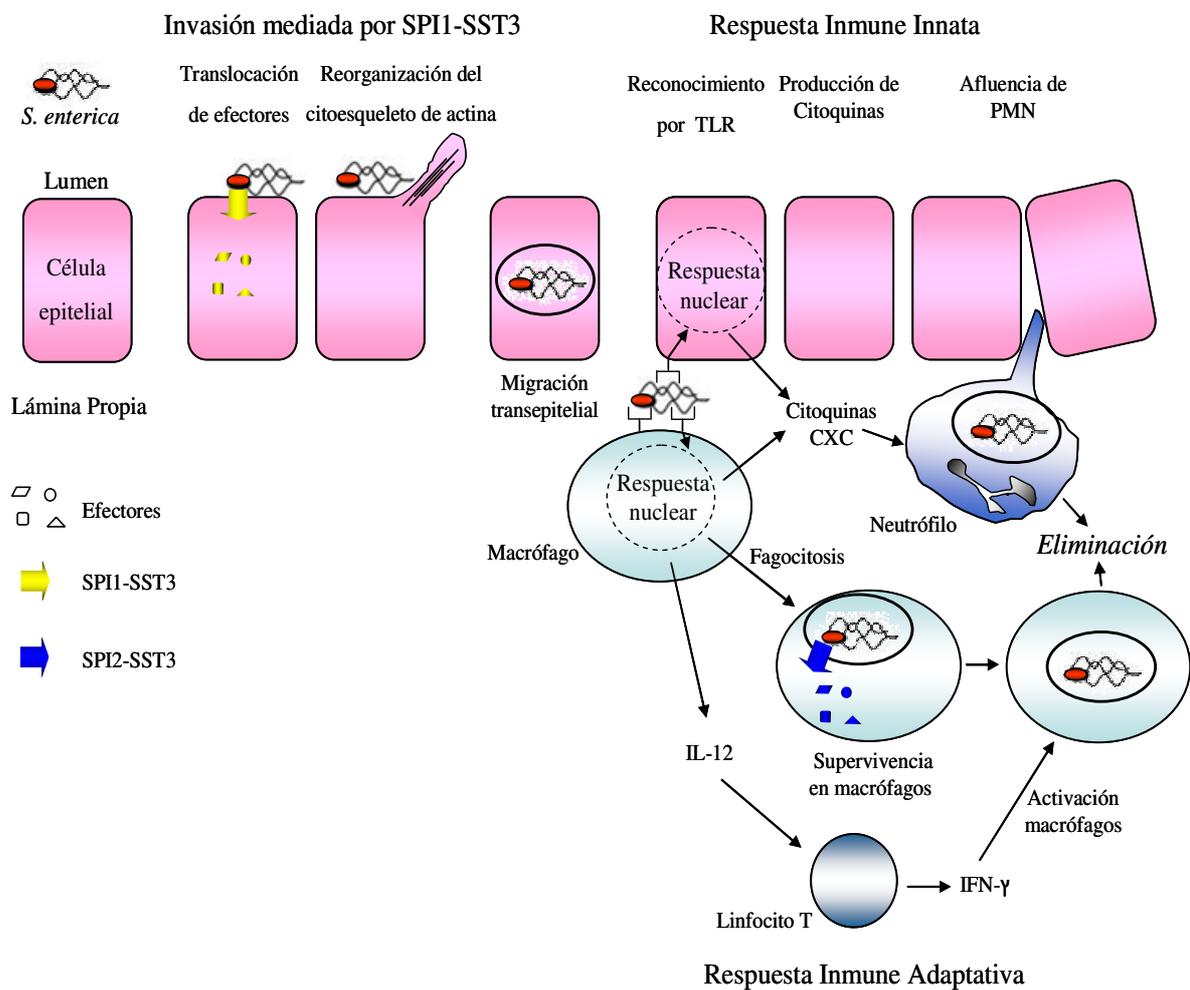


Figura 5. Inducción de enfermedad intestinal por *S. enterica* (Raffatellu *et al.*, 2006)

Una vez invadido el epitelio intestinal, las bacterias se translocan rápidamente, alcanzando la lámina propia. Aquí, su reconocimiento por receptores localizados tanto en la superficie de macrófagos como en la cara interna de las células intestinales, origina la producción de más citoquinas CXCL, por ambos tipos de células. Esto provoca la afluencia masiva de PMN, señal de identidad de la diarrea inflamatoria causada por los serotipos no tifoideos de *S. enterica*. Los neutrófilos fagocitan a las bacterias, destruyéndolas eficazmente. Por el contrario, *S. enterica* posee la capacidad de sobrevivir en el interior de los macrófagos, gracias a la actuación de un segundo SST3, codificado por la isla de patogenicidad SPI2, y de otros factores de virulencia (apartado 4.b). Sin embargo, los macrófagos que han reconocido y fagocitado a las bacterias también liberan IL-12, responsable del inicio de la respuesta inmune específica. Esta interleucina actúa sobre los linfocitos T de tipo Th1, que a su vez liberan sustancias, como el interferón γ , que activan a macrófagos, adquiriendo éstos la capacidad de destruir a las bacterias que han sobrevivido en su interior (Fig. 5; Raffatelli *et al.*, 2006).

El período de incubación tras la ingestión de alimentos o agua contaminados con *Salmonella* oscila entre ocho y 72 horas y el cuadro clínico se inicia con náuseas y vómitos seguidos de dolor abdominal y deposiciones diarreicas, normalmente de moderado volumen y que suelen contener PMN (Mims *et al.*, 1995). Aparece fiebre en más de la mitad de los casos, pudiendo alcanzarse incluso temperaturas de 38-39°C. Es frecuente la aparición de cólicos abdominales. Con menos frecuencia se han descrito síntomas como cefaleas, mialgias y otros de tipo sistémico (Miller y Pegues, 2000). Normalmente se trata de una enfermedad autolimitada, desapareciendo los síntomas en un período de dos a cinco días, en el caso de la enteritis, o de dos a tres semanas, en el caso de la enterocolitis, más debilitante. La remisión de los síntomas coincide con la puesta en marcha de la respuesta inmune específica del hospedador, que consigue controlar la infección, gracias a la activación de los macrófagos.

3.b. Septicemia con o sin infección focal

En grupos de riesgo, fundamentalmente en personas inmunocomprometidas, pero también en jóvenes y adultos aparentemente sanos, las infecciones intestinales por *Salmonella* pueden evolucionar hacia infecciones extraintestinales. Esto se relaciona con la incapacidad de los macrófagos de destruir a las bacterias ingeridas. Probablemente transportada por fagocitos, *S. enterica* se dispersa por el organismo, inicialmente por vía linfática y después por vía sanguínea. Así se origina una bacteriemia que puede ser subclínica (aparición transitoria de bacterias en sangre), o sintomática, a consecuencia de la multiplicación bacteriana, con riesgo elevado de evolucionar a septicemia. La septicemia puede transcurrir como infección no localizada, que se

manifiesta con fiebre, cuyos síntomas pueden persistir varias semanas e incluso degenerar en shock séptico, debido a la actuación de la endotoxina a nivel de sistema circulatorio. Además, al diseminarse por el organismo, *S. enterica* puede llegar a colonizar diversos órganos, provocando infecciones focales que afectan fundamentalmente al tracto urinario, vesícula biliar, hígado, huesos, etc. Se han observado también meningitis, neumonías, endocarditis y otros cuadros clínicos graves (Rodríguez *et al.*, 1998, 2006d; Benenson *et al.*, 2001). Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), anualmente se registran millones de salmonelosis no tifoideas, de las cuales sólo algunos miles terminan con la muerte del paciente.

3.c. Fiebres entéricas

Producidas generalmente por los serotipos Typhi, responsable de la fiebre tifoidea y cuyo reservorio es el hombre, así como Paratyphi A, B y C, que causan fiebres paratifoideas, cuyos reservorios son el hombre y con menor frecuencia los animales domésticos. En ambos casos se trata de enfermedades sistémicas severas que se relacionan con la capacidad de las bacterias de sobrevivir y multiplicarse dentro de fagocitos mononucleares. El período de incubación varía según la dosis infectiva y oscila entre una y tres semanas en el caso de la fiebre tifoidea, siendo más corto (de uno a diez días), en las fiebres paratifoideas, que revisten menor gravedad.

Centrándonos en el serotipo Typhi (Everest *et al.*, 2001), mejor caracterizado, las bacterias ingeridas llegan al intestino delgado y, vía células M de las placas de Peyer (primera exposición de las placas de Peyer a *S. Typhi*), migran a los ganglios linfáticos mesentéricos, donde se multiplican. Desde el sistema linfático son liberadas al torrente sanguíneo, lo que permite su rápida dispersión (bacteremia primaria transitoria). Las bacterias son eliminadas de la sangre por los macrófagos que recubren los sinusoides del hígado, bazo y médula ósea, donde se multiplican activamente. De ahí regresan a la sangre (bacteremia secundaria), hecho que marca el inicio de las manifestaciones clínicas. Estas comienzan con incrementos diarios y graduales de la temperatura, acompañados de síntomas pseudogripales (malestar general, anorexia, cefaleas) e incluso problemas neurológicos.

Las bacterias vuelven a ser retiradas de la sangre por los macrófagos y, vía hígado, pueden alcanzar la vesícula biliar. Esto permite la reinfección del tracto intestinal, estableciéndose la bacteria en las placas de Peyer del íleon distal (segunda exposición de las placas de Peyer a *S. Typhi*), donde causa inflamación, ulceración y necrosis. Tres semanas después del inicio de la infección pueden producirse hemorragias en la zona ulcerada, e incluso perforación intestinal con peritonitis y septicemia subsiguiente, siendo ésta la causa más común de muerte por fiebre tifoidea.

Se estima que hay unos 22 millones de nuevos casos en el mundo anualmente y unas 200.000 muertes. La mayoría de estas infecciones tienen lugar en países en vías de desarrollo,

donde la enfermedad es endémica. En los países desarrollados sin embargo, las fiebres entéricas son infecciones esporádicas que suelen darse en personas que retornan de viajes a países que presentan este endemismo (Basnyat *et al.*, 2005; Connor y Schwartz, 2005).

3.d. Estado de portador

Después de una infección por *Salmonella* (mayoritariamente infección intestinal, fiebre entérica o infección urinaria), la eliminación de la bacteria por las heces o la orina persiste durante tiempos variables (generalmente algunas semanas). En tal caso se habla de portadores convalecientes.

También existe el estado de portador crónico asintomático, que constituye una forma de infección más frecuente aún que la inflamación intestinal aguda, y puede deberse al contacto con dosis infectivas bajas de *Salmonella*. Se consideran igualmente portadores crónicos aquéllos que continúan la eliminación de la bacteria en heces por períodos superiores a un año, hecho que ocurre entre el 1% y el 3% de los pacientes con fiebre tifoidea, que llegan a excretar cantidades del orden de 10^6 - 10^9 bacterias por gramo de heces. En otros serotipos no tifoideos el estado de portador crónico se da en el 1% de los pacientes mayores de quince años y en el 5,4% de los menores de dos años (Jones y Falkow, 1996; Miller y Pegues, 2000).

4. PATOGENICIDAD

De acuerdo con lo expuesto anteriormente, la estrategia patogénica de *S. enterica* incluye la penetración de la barrera intestinal y la interacción con células del sistema inmune donde actúa como parásito intracelular. En consecuencia, los mecanismos de virulencia (entendiendo ésta como grado de patogenicidad en distintas cepas de la misma especie) de *S. enterica* son necesariamente complejos (Marcus *et al.*, 2000). De hecho, se estima que el 4% del genoma de la cepa tipo de *Salmonella*, Typhimurium LT2, se requiere para la infección letal del ratón, lo cual supone unos 200 genes de virulencia (Bowe *et al.*, 1998; McClelland *et al.*, 2001).

Podemos distinguir dos grupos de factores de virulencia (Fig. 6). Por un lado, estructuras superficiales de la bacteria que son, además, dianas del sistema inmune del hospedador. Se incluyen aquí el LPS, con actividad tóxica, debido fundamentalmente al lípido A; los flagelos, que dirigen a la bacteria hacia el epitelio intestinal, mediante quimiotaxis, permiten atravesar la espesa capa de mucina, y contribuyen al proceso de inflamación; la cápsula, directamente relacionada con la capacidad invasiva del serotipo Typhi; y las fimbrias. Los tres primeros ya han sido comentados en el apartado 2. Por otro lado, existen genes de virulencia, localizados en el cromosoma o en plásmidos, que codifican factores solubles que modifican la fisiología celular del hospedador o que

protegen a la bacteria de sistemas antimicrobianos del mismo. Estos genes pueden estar sueltos, formando pequeñas agrupaciones (islotos) y/o en agrupaciones mayores, llamadas islas de patogenicidad (PI) (Schmidt y Hensel, 2004).

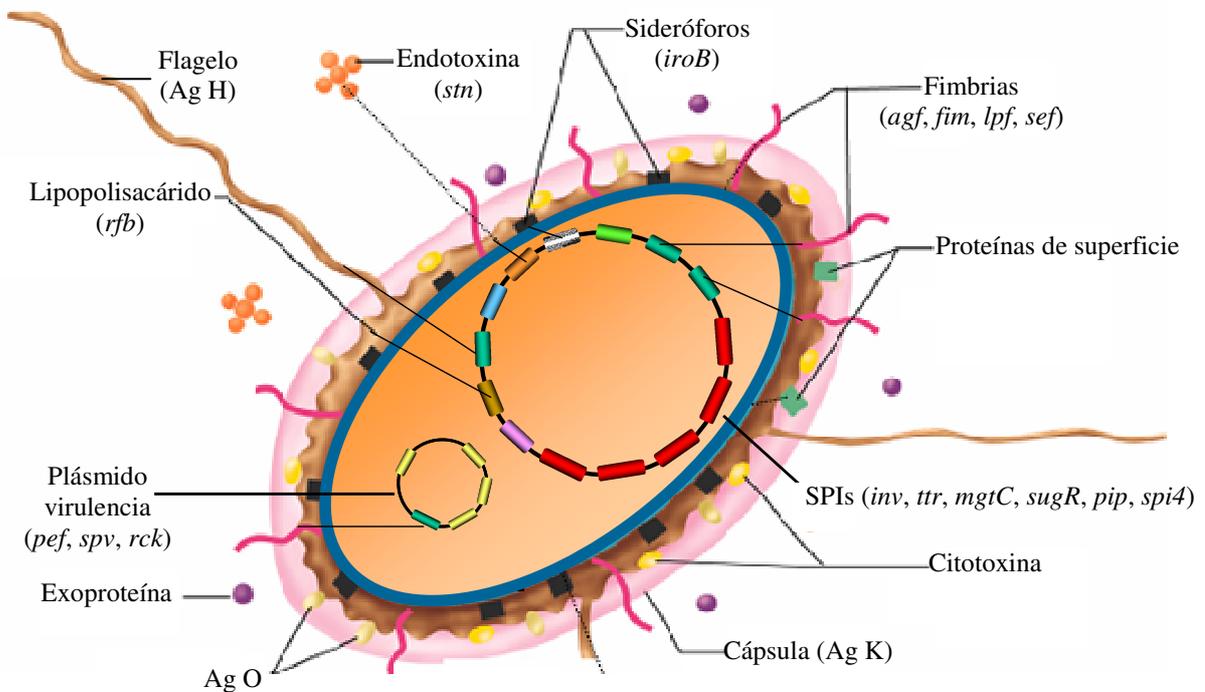


Figura 6. Localización de factores de virulencia representativos de *S. enterica* (Madigan *et al.*, 1998b, modificado). Se incluyen algunos genes implicados en virulencia

4.a. Fimbrias

Salmonella tiene varios tipos de fimbrias o “pili” que son estructuras de superficie de naturaleza proteica consideradas como adhesinas, por facilitar la unión de la bacteria a receptores específicos de las células del hospedador. Entre ellas están las “long polar fimbria” (Lpf) que median la unión de la bacteria a las placas de Peyer en el ratón. El operón implicado en la expresión de esta clase de fimbrias es *lpfABCDE*, que experimenta variación de fase. Así, la bacteria alterna entre expresar y no expresar Lpf, en respuesta a la producción por parte del hospedador de anticuerpos específicos frente a este tipo de fimbrias (Fierer y Guiney, 2001; Kingsley *et al.*, 2002).

Otro tipo son las “thin aggregative fimbria” (Tafi) que están presentes en la mayoría de los serotipos y requieren la transcripción divergente de los operones *agfDEFG* y *agfBAC* para ser

funcionales (Romling *et al.*, 1998). Las subunidades AgfA y AgfB constituyen la estructura de la fimbria. Ambas presentan un tamaño parecido y estructuras similares, sin embargo sus características bioquímicas son muy diferentes. Aunque las dos son necesarias para la polimerización de la fimbria, AgfA es la proteína mayoritaria. El operon *agfDEFG* participa en la formación y correcto ensamblaje de las fimbrias (White *et al.*, 2003a).

Salmonella presenta además “fimbrias tipo 1”, codificadas por el operón *fimAICDHF* y fimbrias codificadas por plásmidos de virulencia, como las del operón *pefABCDI*. Están descritos, en *S. Typhimurium*, hasta un total de 13 operones cromosómicos implicados en la formación de fimbrias (Humphries *et al.*, 2003; Weening *et al.*, 2005). No todas ellas están asociadas exclusivamente con la virulencia de la bacteria ya que cepas no patógenas pueden contener uno o más tipos de fimbrias.

4.b. Islas de patogenicidad

Las PI son largas agrupaciones de genes que contribuyen a un determinado fenotipo de virulencia, que generalmente se manifiesta en momentos claves del proceso infectivo. Así en el caso de algunas bacterias entéricas, la adquisición de una única PI puede convertir a un microorganismo comensal en uno patógeno. Esto explicaría la emergencia de nuevos patógenos como resultado de la evolución de cepas no virulentas. No obstante la adquisición de una isla de patogenicidad no siempre garantiza la conversión de la bacteria en patógeno, sino que la virulencia va a depender del microorganismo receptor y de su hospedador (Marcus *et al.*, 2000).

Las islas de patogenicidad de *Salmonella* (SPIs) se definen como largas agrupaciones de genes dentro del cromosoma bacteriano, que codifican para determinantes responsables de establecer las interacciones específicas con el hospedador y que son necesarios para la expresión de virulencia bacteriana en un modelo animal. Al igual que otras islas, las SPIs generalmente presentan un contenido en GC menor que el del resto del cromosoma bacteriano y están, frecuentemente, insertadas dentro de genes que codifican ARNt. Esto podría indicar que han sido adquiridas por transferencia horizontal a partir de fagos o plásmidos y permite que rápidamente unas especies adquieran las complejas funciones de virulencia que presentan otras. En el caso de algunas SPIs altamente inestables se han detectado secuencias asociadas a elementos genéticos móviles como integrasas, transposasas, repeticiones directas o genes fágicos (Hensel, 2004).

SPI1. Es una de las islas mejor caracterizada, se trata de una inserción de 40 Kb en el cromosoma bacteriano que presenta un contenido en GC significativamente más bajo que el contenido medio del genoma de *Salmonella*. No se encuentra asociada a un gen de ARNt. Esta isla es necesaria para que se produzca la infección intestinal, mediando la invasión de células no-

fagocíticas por *Salmonella*. Interviene también en la patogenicidad intestinal: inflamación del epitelio y síntomas diarreicos (Marcus *et al.*, 2000; Wallis y Galyov, 2000; Zhou y Galán, 2001).

SPI1 contiene, al menos, 29 genes (Fig. 7), que codifican los componentes estructurales de un sistema de secreción de tipo 3 (SPI1-SST3) (*invA*, *invH* y *prgH*), proteínas que forman un poro (traslocón) (*sipB*, *sipC*), por el que penetran en el citosol de la célula eucariota proteínas efectoras secretadas por dicho sistema, algunas de estas proteínas efectoras (*spt*, genes *sip*) y proteínas reguladoras (*hilA*).

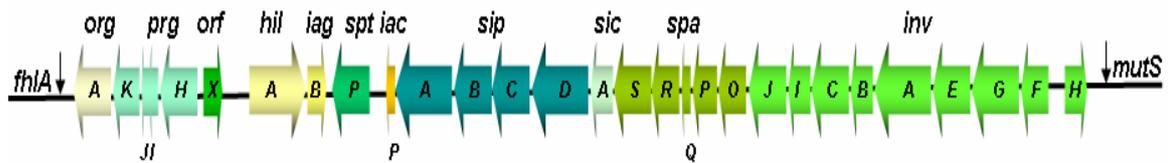


Figura 7. Representación de la SPI1 en *S. enterica* (Collazo y Galán, 1997)

La invasión depende de la actuación del SPI1-SST3, que inyecta en la célula eucariota una gran variedad de efectores, no todos codificados por SPI1. Estas moléculas interactúan directamente con los sistemas de señalización celulares, forzando la entrada del patógeno. Entre ellas se incluyen dos activadores de las GTPasas Cdc42 y Rac de la familia Rho (SopE y SopE2), una inositol fosfato fosfatasa (SopB, conocida también como SigD), una proteína de unión a actina (SipA, conocida también como SspA) y dos efectores de función desconocida (SopA y SopD). En conjunto actuarán de forma concertada para permitir la entrada de la bacteria en células del epitelio intestinal y para desencadenar el proceso inflamatorio en la mucosa. Crucial para la internalización es la polimerización del citoesqueleto de actina en el sitio de contacto con la bacteria, que culmina con la formación de proyecciones (“ruffles”) en la membrana de la célula hospedadora. Estas prolongaciones engloban a la bacteria y después la internalizan. Para completar la entrada y reparar el citoesqueleto de las células epiteliales, *Salmonella* inicia la despolimerización de la actina mediada por la traslocación del efector bacteriano SptP, inhibidor de la actividad GTPasa de Cdc42 y Rac. Al final del proceso, conocido como macropinocitosis, las bacterias se localizan en el interior de las células hospedadoras, dentro de vesículas membranosas denominadas SVCs (vacuolas que contienen *Salmonella*). Este mecanismo de entrada (conocido como “triggering”) es diferente a la endocitosis mediada por receptor (“zippering”) que utilizan otras bacterias patógenas (Sansonetti, 2002).

SPI1-SST3, a través de distintos efectores (SopE, SopE2, SopB) contribuye al inicio de la respuesta inflamatoria. Así, la activación de cascadas de quinasas y de factores de transcripción nucleares, conducen a la liberación de citoquinas pro-inflamatorias, que promueven la migración de neutrófilos. SopB interfiere también con el flujo de iones y SipB, uno de los componentes del traslocón, interacciona además con la caspasa-1 celular, induciendo apoptosis de macrófagos (Fig. 8).

SPI1 está presente en la genoespecie *S. bongori* y en todos los serotipos analizados hasta el momento de *S. enterica*. Sólo en algunos aislamientos ambientales se han encontrado genes asociados con la movilidad del ADN y deleciones en la SPI1 (Hensel, 2004).

SPI2. Esta isla se relaciona con la capacidad de la bacteria de sobrevivir en el interior de los macrófagos y de multiplicarse dentro de SVCs en fagocitos y otras células eucariotas. Por ello, resulta esencial en la infección sistémica (Schmidt y Hensel, 2004). Esta isla constituye un excelente ejemplo de complejidad y eficacia en la adaptación de un patógeno a un determinado ambiente, en este caso, el interior de células hospedadoras (Fig. 8).

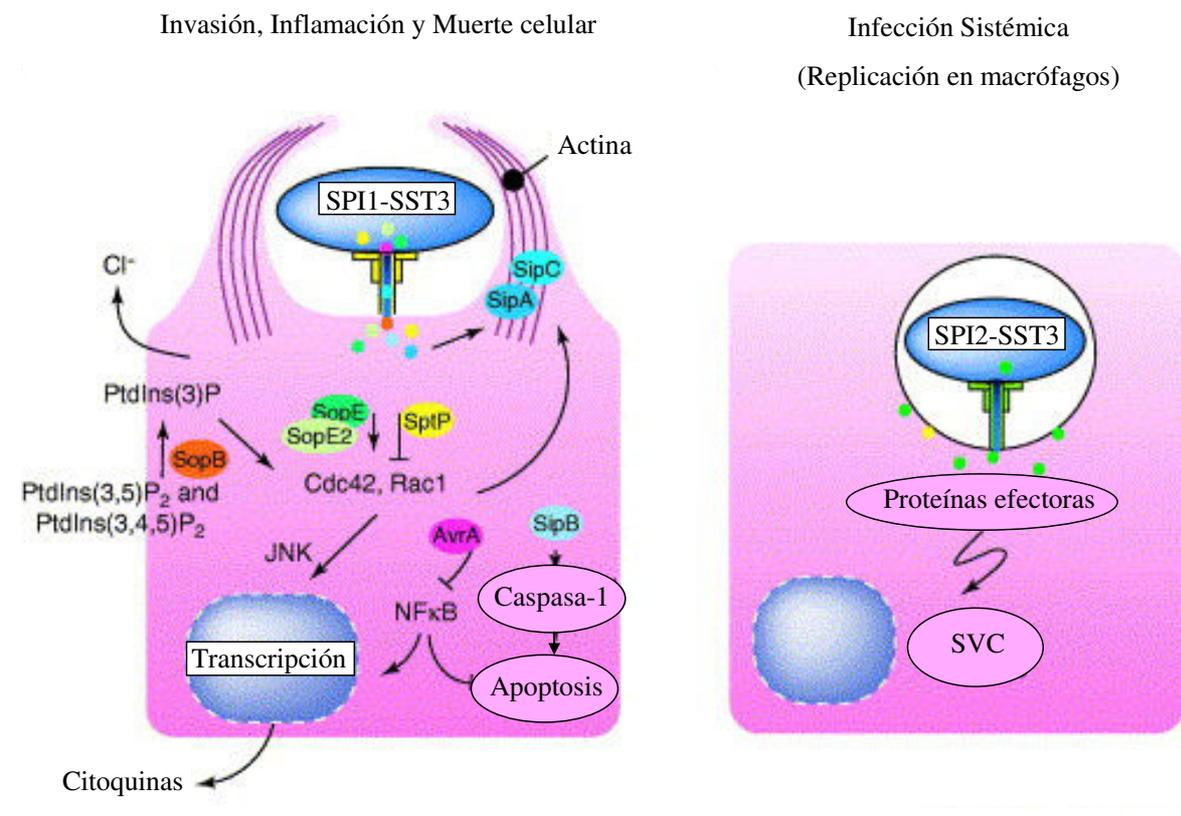


Figura 8. Actuación de los SST3 codificados por las PI 1 y 2 de *S. enterica* (Hapfelmeier y Hardt, 2005)

SPI2 tiene también unas 40 Kb y se inserta al lado de *valV*, gen que codifica el ARNt^{Val}, específico para valina. Se compone de al menos dos elementos distintos que pueden haber sido adquiridos en eventos evolutivos diferentes. Uno de ellos, de 25 Kb, con un contenido en GC del 43%, sólo se encuentra en *S. enterica* y codifica para un SST3 (SPI2-SST3) que se activa cuando la bacteria está en el interior de la célula hospedadora, translocando proteínas efectoras a través de la membrana de la SCV. Esta región presenta al menos cuatro operones diferentes, *ssa* (aparato del sistema de secreción), *sse* (proteínas del translocón, efectoras, chaperón), *ssc* (chaperones) y *ssr* (reguladores del sistema de secreción). La segunda región, de unas 15 Kb y contenido GC del 54%, presenta un grupo de genes *ttr* implicados en la respiración anaerobia (reducción del tetrionato), además de diferentes pautas de lectura abierta (ORF) de función desconocida (Fig. 9). Está presente tanto en *S. enterica* como en *S. bongori* (Marcus *et al.*, 2000; Hensel, 2004).

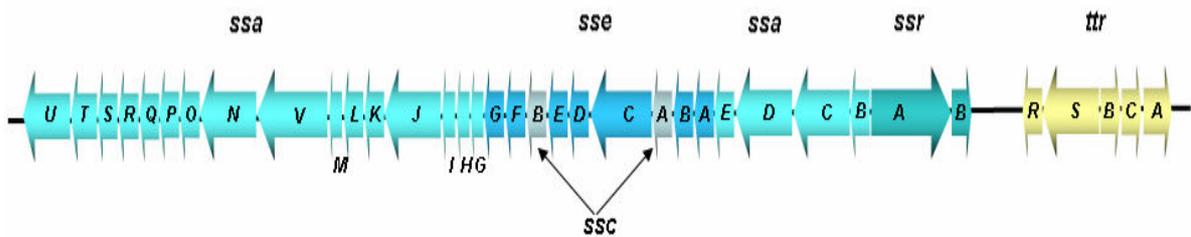


Figura 9. Representación de SPI2 de *S. enterica* (Kuhle y Hensel, 2004)

SPI2-SST3 actúa en el interior de células eucarióticas, translocando proteínas efectoras a través de la membrana de las SVCs. Las actividades fisiológicas de SPI2-SST3 son múltiples. Interfiere con distintos aspectos del tráfico vesicular, impidiendo la fusión de SCVs con endosomas y lisosomas y, por tanto, la destrucción intracelular; evita la muerte de las bacterias por acción de especies reactivas de oxígeno (ROSs) o de nitrógeno (RNSs) producidas por los fagocitos; controla la dinámica de la membrana de las SCVs, el ensamblaje de una red de actina en torno a las SVCs; origina la formación de extensiones filamentosas de la membrana de las SCVs (SIF; “*Salmonella* induced filaments”), que aparecen asociados con microtúbulos; y retrasa la destrucción apoptótica de las células infectadas. La diversidad de actividades en que participa SPI2-TSS3 implica la existencia de numerosos efectores traslocados por el sistema. Hasta el momento se han identificado 16, la mayoría no codificadas por SPI2, cuya función sólo se conoce en parte (Waterman y Holden, 2003; Abrahams y Hensel, 2006).

SPI3. Es una inserción de 17 Kb en el *locus selC*, que codifica el ARNt^{Sel}, específico para selenocisteína, con un contenido en GC del 47,5%. La principal función de virulencia de esta isla está codificada por el operón *mgtCB*, un sistema de alta afinidad por Mg²⁺, implicado en la adaptación a las limitaciones nutricionales del hábitat intrafagosómico (Fig. 10). Este operón está regulado por *phoP/Q*, que se ubica en una isleta cromosómica (Blanc-Potard *et al.*, 1997; Schmidt y Hensel, 2004). Otras proteínas codificadas SPI3 son MarT y MisL, que podrían participar en procesos de patogenicidad como la infección crónica y la especificidad de hospedador (Marcus *et al.*, 2000).

El análisis de la distribución de SPI3 en las dos especies aceptadas, *S. bongori* y *S. enterica*, así como en las subespecies y varios serotipos de esta última, revelan grandes variaciones en su estructura, que van desde deleciones a inserciones de genes individuales o grupos de genes. La mayoría se encontraron en la zona adyacente a *selC*, mientras la región correspondiente al operón *mgtCB* y otros genes, como *marT* o *fidL*, están más conservados (Blanc-Potard *et al.*, 1999; Amavisit *et al.*, 2003). La variación observada en SPI3 así como la inserción de diferentes PIs en el *locus selC* de distintos patógenos, señalan a éste como un punto caliente de integración de ADN exógeno (Hensel, 2004).

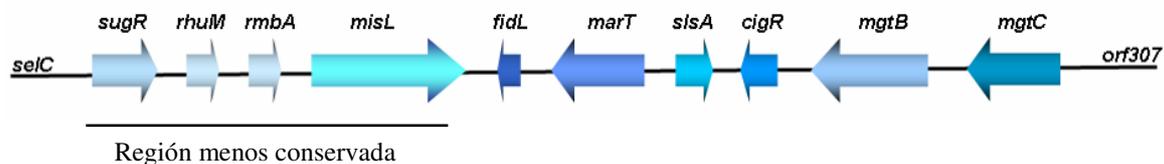


Figura 10. Representación de la SPI3 en *S. enterica* (Amavisit *et al.*, 2003)

SPI4. Es una región de 25 Kb adyacente al gen *ssb*, que codifica una proteína de unión al ADN de cadena sencilla. SPI4 parece formada a partir de múltiples procesos de captación de ADN exógeno, dado que sus ORFs tienen un contenido en GC más bajo que el resto del genoma bacteriano mientras que los espacios intergénicos lo tienen más elevado. Esta isla posee al menos 18 ORFs y se cree que podría codificar para un SST1 que media la secreción de toxinas, además de llevar genes implicados en la supervivencia en macrófagos. Como *S. Thyphimurium* es capaz de inducir la apoptosis de los macrófagos infectados, se postula que SPI4 estaría implicada en la secreción de una citotoxina. Sin embargo, su función aún está por determinar (Marcus *et al.*, 2000; Schmidt y Hensel, 2004).

SPI5. Es un pequeño *locus* de 7,6 Kb insertado próximo al extremo 5' del gen *serT*, que codifica el ARNt^{Ser}, específico para serina. SPI5 contiene información para proteínas efectoras que son translocadas por los dos SST3 implicados en la virulencia de *Salmonella*. Tal es el caso de SopB inyectada en la célula eucariota por el SPI1-SST3. Además, la expresión de *sopB* esta bajo el control de HilaA, regulador de transcripción codificado por SPI1. Por otro lado, PipB es una proteína que pasa al interior de la célula hospedadora a través del SPI2-SST3 y está bajo el control de SsrAB, sistema de dos componentes, codificado por esta última isla (Fig. 11).

En cuanto al grado de conservación de SPI5, la región correspondiente a *sopB* se encuentra altamente conservada, estando presente tanto en *S. bongori* como *S. enterica*, mientras que la región *pipAB*, está ausente en *S. bongori* y *S. enterica* subespecie *salamae*. Esto lleva a suponer que ambas regiones se adquirieron como elementos independientes (Hensel., 2004).

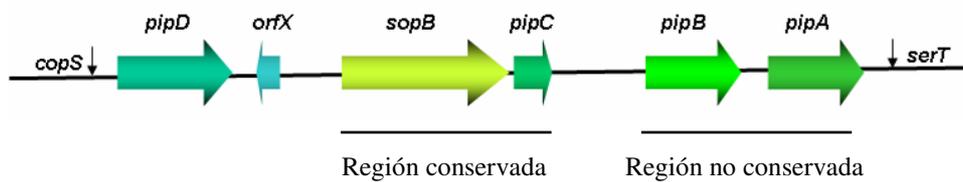


Figura 11. Representación de la SPI5 en *S. enterica* (Knodler *et al.*, 2002)

SPI7 o Isla Mayor de Patogenicidad (MPI). Es específica de los serotipos Typhi, Paratyphi C y Dublin. Tiene unas 134 Kb y se encuentra adyacente al gen *pheU* del ARNt^{Phe}, específico para fenilalanina. MPI contiene diferentes genes de virulencia que codifican el polisacárido capsular Vi (*locus viaB*), la proteína efectora SopE (de origen fágico; comentada anteriormente) y cuatro tipos de fimbrias relacionadas con la invasión de células epiteliales por el serotipo Typhi. MPI presenta, además, diversos genes relacionados con la movilidad del ADN, lo que indicaría que es una estructura mosaico adquirida en distintos momentos, por transferencia horizontal de material genético.

Otras SPI. La presencia de otras SPIs, designadas SPI6, SPI8 a SPI10 ha sido inferida a partir de la secuencia de los genomas de distintos serotipos de *Salmonella*. Estos *loci* tienen características de PIs y genes de función desconocida pero con secuencias similares a genes de virulencia (Schmidt y Hensel, 2004).

4.c. Islotes de patogenicidad y genes sueltos

Una gran diversidad de genes codifica moléculas necesarias en diferentes fases del proceso patogénico y parece que forman parte de “islotes”. Entre ellos se encuentran: *sifA* (implicado en la multiplicación en macrófagos), *pagC* y *msgA* (intervienen en la supervivencia en el interior de los fagosomas), *iviVI* (relacionado con la adhesión e invasión de los enterocitos) y algunos genes de fimbrias (Groisman, 1998). Otros genes se encuentran de manera aislada, entre ellos los que codifican toxinas (*stn*, *ast*), sideróforos implicados en la captación de hierro (como *iroB*), resistencia al estrés oxidativo (*sodCI*), reguladores transcripcionales de distintos genes de virulencia (*phoP/Q*, *slyA*), etc (Anexo II, Tabla II.c).

4.d. Plásmidos de virulencia

La existencia de plásmidos portadores de genes de virulencia (plásmidos-V) fue sugerida por primera vez en 1982 (Jones *et al.*, 1982). Hasta la fecha han sido encontrados en unos pocos serotipos de *S. enterica* pertenecientes a la subespecie I, particularmente en los más frecuentes y adaptados al hombre (Enteritidis, Typhimurium, Choleraesuis y Dublin). Estos plásmidos-V tienen un tamaño entre 50 y 150 Kb (Fig. 12), han sido denominados “plásmidos serotipo-específicos” y todos ellos portan la región *spv* (*Salmonella* plasmid *yirulence*) formada por cinco genes, designados *spvRABCD*, que podrían estar implicados en la multiplicación intracelular de *Salmonella*. Además pueden contener otros *loci* como los que intervienen en la biosíntesis de fimbrias (operón *pef*) o en la resistencia al suero (*rck* y *rsk*), cuyos productos desempeñan un papel muy importante en diferentes etapas del proceso de infección. El operón *pef* contiene cuatro genes (*pefBACDI*) que determinan la formación de fimbrias. Los productos de estos genes están implicados en un tipo de adhesión diferente a la inducida por los genes *lpf*, de codificación cromosómica, que promueven la adhesión de *Salmonella* a las placas de Peyer de ratón en experimentos *in vivo*. También se han identificado genes que codifican proteínas con acción reguladora, como *tlpA* cuyo producto actúa como termosensor, reprimiendo su propia expresión cuando se produce un incremento en la temperatura.

Aunque el operón *spv* es común a todos los plásmidos de virulencia, otros *loci* o genes pueden presentar variaciones (Baümmler *et al.*, 1998). Así los plásmidos-V de Typhimurium, Enteritidis y Choleraesuis portan dos replicones funcionales, *repB* y *repC*, encargados de controlar el bajo número de los mismos (1-2 copias por cromosoma), el de Typhimurium contiene además el operón *tra* funcional, implicado en la transferencia del plásmido por conjugación, en algunos se identificaron genes que codifican sideróforos, así como diversos *loci* de función desconocida (Rotger y Casadesus, 1999; Guerra *et al.*, 2001, 2002, 2004a; van Asten y van Dijk, 2005).

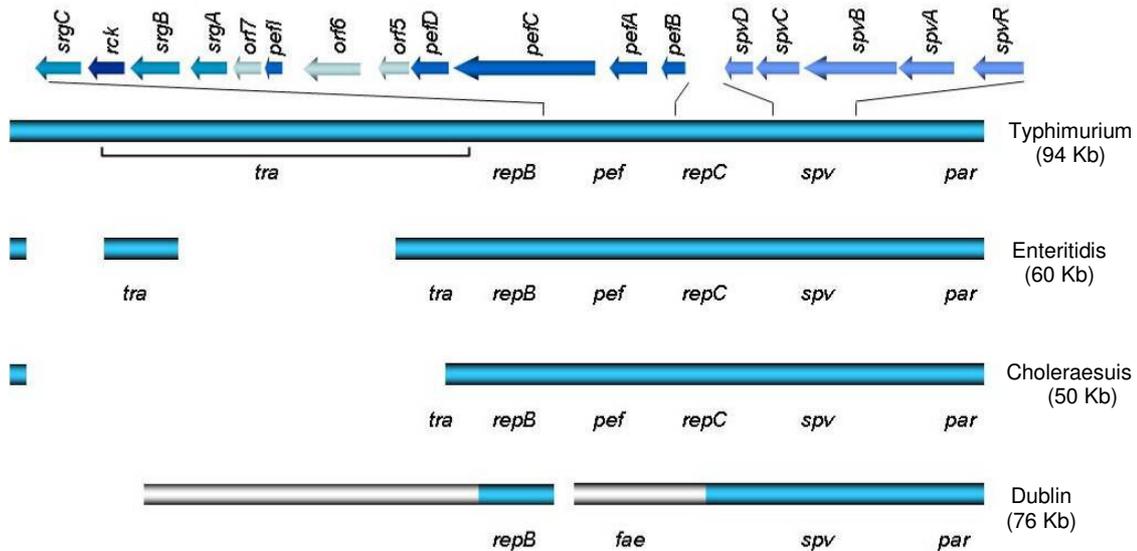


Figura 12. Mapa genético de los plásmidos de virulencia de *S. enterica* (Baümleer *et al.*, 1998)

5. RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS

La resistencia a los antimicrobianos es uno de los ejemplos mejor conocidos de adaptación rápida de las bacterias a un ecosistema que contenga estas moléculas. Aunque no está claro el origen de los genes de resistencia (R), se cree que muchos provienen de los microorganismos productores de antibióticos, que los poseen como forma de protección frente al efecto de las sustancias que ellos mismos elaboran; otros, se deben a mecanismos de mutación que han permitido variaciones en genes esenciales, defendiendo a sus productos del ataque de determinados agentes. Los genes-R pueden mantenerse en las bacterias originarias y su descendencia (transmisión vertical), o bien diseminarse de forma horizontal, entre bacterias más o menos relacionadas. En la transmisión horizontal juegan un papel muy importante los elementos genéticos móviles (EGMs) como plásmidos, transposones e integrones/casetes génicas. El mantenimiento de estos determinantes R se fomenta por el uso de antimicrobianos no sólo con fines terapéuticos y profilácticos en clínica y veterinaria, sino también en producción animal como promotores del crecimiento. Así, las bacterias zoonóticas, como los serotipos no tifoideos de *Salmonella*, pueden adquirir la resistencia en el hospedador animal, previamente a su transmisión al hombre a través de la cadena alimentaria. De hecho, el uso indiscriminado de antibióticos ha sido el principal factor que ha favorecido el aumento de bacterias resistentes.

5.a. Bases bioquímicas de la resistencia en *S. enterica*. Genes implicados

Existen cuatro mecanismos principales mediante los cuales las bacterias son capaces de eludir la acción de los agentes antimicrobianos (French y Phillips, 1997):

1. Presencia de enzimas específicos que modifiquen o inactiven el antibiótico antes o después de penetrar en la bacteria.
2. Modificación de la membrana bacteriana, haciéndola menos permeable al antimicrobiano.
3. Expulsión activa del antibiótico fuera de la bacteria.
4. Síntesis de una molécula alternativa o modificación de la diana celular.

Estos mecanismos no tienen por qué darse de forma aislada, sino que dos o más pueden interactuar para determinar el nivel final de resistencia de un microorganismo.

Los genes y mecanismos bioquímicos seleccionados con mayor frecuencia en *S. enterica* (Michael *et al.*, 2006) afectan básicamente tanto a las “familias” o tipos de antimicrobianos utilizados en terapia de la salmonelosis (como beta-láctamicos, aminoglicósidos, fenicoles, quinolonas o trimetoprim), como a otros no utilizados específicamente para su control (como tetraciclinas y sulfonamidas).

5.a.1. Resistencia mediada por enzimas modificadores

β -lactamasas: El mecanismo más importante de resistencia a β -lactámicos es la producción de enzimas específicos (β -lactamasas) que se unen al antibiótico hidrolizándolo. Se conocen entre 350 y 400 β -lactamasas, algunas de las cuales están asociadas con ciertas especies bacterianas, mientras otras se encuentran ampliamente distribuidas en distintas especies y géneros. Las β -lactamasas detectadas en *Salmonella* constituyen un grupo muy diverso de enzimas, a su vez codificados por un número considerable de genes diferentes. Se han identificado, al menos, diez subgrupos distintos de genes que codifican para β -lactamasas (*bla*): TEM; SHV; PSE; OXA; PER; CTX-M; CMY; ACC; DHA; KPC. Entre las β -lactamasas tipo TEM, podemos distinguir dos grupos. El primero de ellos, codificado por los genes *bla*_{TEM-1} y *bla*_{TEM-135}, engloba enzimas capaces de modificar un amplio espectro de penicilinas. El segundo grupo, codificado, entre otros, por los genes *bla*_{TEM-3}, *bla*_{TEM-4} o *bla*_{TEM-131}, se corresponde con las llamadas β -lactamasas de espectro ampliado (ESBLs), que incluyen además a las β -lactamasas de tipo SHV, PER y CTX-M y que son capaces de inactivar oximinocefalosporinas y monobactámicos. Las β -lactamasas tipo PSE se conocen también como CARB-2 β -lactamasas por hidrolizar, además de penicilinas, carbenicilinas. En *Salmonella* también se han identificado diversas β -lactamasas de tipo OXA, que presentan

actividad contra oxacilinas y cloxacilinas, y diferentes grupos de AmpC β -lactamasas, tales como CMY, ACC y DHA, capaces de hidrolizar todos los β -lactámicos excepto los carbapenemas. Finalmente, una β -lactamasa de tipo KPC, que confiere resistencia a penicilinas, cefalosporinas y carbapenemas, ha sido detectada en una cepa clínica en 2003 (Miriagou *et al.*, 2003). Varios trabajos describen la presencia de más de un tipo de gen *bla* en un mismo aislamiento. De todos los genes *bla* conocidos, los de mayor importancia clínica son aquellos que codifican para ESBLs.

Enzimas modificadores de aminoglicósidos: la resistencia a aminoglicósidos mayoritariamente está mediada por enzimas capaces de modificar grupos amino o hidroxilo de la molécula del aminoglicósido, bloqueando así su actividad antibacteriana, al impedir la unión del antibiótico a las proteínas ribosomales diana. Se conocen tres tipos de enzimas: O-adeniltransferasas, N-acetiltransferasas y O-fosfotransferasas. Cada grupo está formado por diferentes proteínas más o menos alejadas estructuralmente. En *Salmonella* los genes de O-adeniltransferasas más comunes son los de tipo *aadA* y *aadB*. El primero media resistencia a estreptomycin y espectinomycin, mientras el segundo confiere resistencia a gentamicina, kanamicina y tobramicina. Dentro del grupo *aadA* existen al menos seis subtipos, *aadA1*, *aadA2*, *aadA5*, *aadA7*, *aadA21*, *aadA22* y *aadA23* (Michael *et al.*, 2006). De los cuatro tipos de genes de N-acetiltransferasas, en *Salmonella* sólo se han detectado *aac(3)* y *aac(6')*. Los más comunes son *aac(3)*, que median resistencia a gentamicina y de los que se han encontrado diferentes tipos en diversos serotipos como Enteritidis, Typhimurium, Thyphi, Agona, o Cholerasuis (Michael *et al.*, 2006). De las cinco clases de fosfotransferasas descritas, sólo aquellas capaces de fosforilar los aminoglicósidos en las posiciones 3', 3'' y 6, se han identificado en aislamientos de *Salmonella*. Los primeros, genes *aphA*, confieren resistencia a kanamicina y neomicina, existiendo diferentes tipos, algunos de ellos encontrados en plásmidos multirresistentes de Cholerasuis o Typhimurium (Chiu *et al.*, 2005; Michael *et al.*, 2006) y otros detectados por PCR en serotipos como Enteritidis o Hadar, por citar algún ejemplo (Frana *et al.*, 2001; Randall *et al.*, 2004). Los otros dos tipos, conocidos como genes *strA* y *strB*, median únicamente resistencia a estreptomycin y normalmente se encuentran juntos, precedidos, en muchos casos, por el gen *sul2*, que confiere resistencia a sulfonamidas. Los genes *str* se han detectado en diferentes serotipos como: Enteritidis, Cholerasuis, Hadar, Typhimurium y Virchow (Pezzella *et al.*, 2004; Randall *et al.*, 2004; Martínez *et al.*, 2005).

Enzimas modificadores de fenicoles: uno de los mecanismos principales de resistencia a fenicoles es la inactivación enzimática mediante cloranfenicol acetil transferasas (Cat) de tipo A o B. En *Salmonella* se han encontrado dos tipos diferentes de proteínas CatA, codificadas por los

genes *catA1* y *catA2*. El primero se encontró en distintos serotipos –incluidos Typhimurium (Guerra *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2004; Herrero *et al.*, 2006), DT104 (Frech *et al.*, 2003), Typhi (Shanahan *et al.*, 2000) y Virchow (Randall *et al.*, 2004; Rodríguez *et al.*, 2006a), entre otros–. Por otro lado, *catA2* se ha detectado en *S. Choleraesuis*, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* y *S. Derby* (Chen *et al.*, 2004; Randall *et al.*, 2004; Chiu *et al.*, 2005). Se conocen tres tipos de genes *catB* –*catB2*, *catB3* y *catB8*– que fueron encontrados en *S. Typhimurium* (Ahmed *et al.*, 2005), *S. Enteritidis* (Villa *et al.*, 2002) y *S. Typhi* (Pai *et al.*, 2003). Es rara la presencia de más de un gen de resistencia a esta familia de antimicrobianos y en estos casos suelen encontrarse genes para los dos mecanismos diferentes de resistencia, uno para la inactivación enzimática y otro para una bomba de expulsión. No obstante Chen *et al.* (2004) describieron la presencia de las dos cloranfenicol acetiltransferasas tipo A en aislamientos de Derby y Typhimurium.

5.a.2. Expulsión activa del antibiótico fuera de la bacteria

Bombas de expulsión de tetraciclinas: se han descrito más de 35 genes diferentes que codifican resistencia a tetraciclina. Sin embargo, sólo cinco de éstos se han encontrado en *Salmonella* –*tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(D)* y *tet(G)*–. Todos ellos codifican para bombas de expulsión asociadas a membrana (Michael *et al.*, 2006). Constan de 12 segmentos transmembrana capaces de exportar tetraciclina, oxitetraciclina, clortetraciclina y doxiciclina. A diferencia de las otras cuatro, la proteína TetB es capaz de exportar también minociclina. Los genes *tet(A)* y *tet(B)* son los encontrados con mayor frecuencia y en un mayor número de serotipos. Es raro, también, que aparezca más de un gen *tet* por aislamiento (aunque *tet(A)* y *tet(G)* se encontraron juntos en *S. Typhimurium* var. Copenhagen DT104; Frech *et al.*, 2003), o que un mismo aislamiento sea portador de más de una copia del gen-R (pero dos copias de *tet(G)* se encontraron en *S. Typhimurium*; Frech y Schwarz, 2000).

Proteínas que expulsan fenicoles: la expulsión activa de cloranfenicol o cloranfenicol/florfenicol de las células bacterianas se lleva a cabo mediante proteínas transportadoras específicas (Cml y Flo). En *Salmonella* existen dos tipos de proteínas transportadoras de fenicoles, el primero de ellos codificado por genes *cmlA* y responsable del transporte de cloranfenicol, se ha encontrado en *S. Typhimurium* (Carattoli *et al.*, 2002), serotipo [4,5,12:i:-] (Guerra *et al.*, 2001), *S. Wien* (Soto *et al.*, 2003b) y *S. Muenchen* (Gebreyes y Thakur, 2005). El segundo tipo de transportador es capaz de movilizar tanto cloranfenicol como florfenicol, esta codificado por genes *floR* de diferentes serotipos (Ng *et al.*, 1999; Boyd *et al.*, 2002; Meunier *et al.*, 2002, 2003; Doublet *et al.*, 2004a, b).

5.a.3. Resistencia por síntesis de enzimas alternativos o modificación de la diana celular

Resistencia a trimetoprim: Se han identificado más de 30 genes diferentes, pero en todos ellos la resistencia está mediada por la producción bacteriana de una dihidrofolato reductasa (*dhfr*) altamente resistente al antibiótico. Estos genes se dividen en base a su estructura en dos tipos mayoritarios, *dhfrA* y *dhfrB* (Michael *et al.*, 2006). En *Salmonella*, únicamente se han detectado genes *dhfrA*, hasta un total de 13 distintos. El más frecuente es *dhfrA1*, descrito en Enteritidis, Typhimurium o Virchow, entre otros serotipos (Lindstedt *et al.*, 2003; Randall *et al.*, 2004; Ahmed *et al.*, 2005; Daly *et al.*, 2005; Rodríguez *et al.*, 2006a, b).

Resistencia a sulfonamidas: en *Salmonella* se conocen tres tipos de genes de resistencia a sulfonamidas: *sul1*, *sul2* y *sul3*, que codifican formas resistentes del enzima dihidropteroico sintetasa. Este enzima interviene en la síntesis del ácido dihidropteroico, compuesto intermediario en la formación del ácido tetrahidrofólico, cofactor requerido en la biosíntesis de bases nitrogenadas y aminoácidos. El gen *sul1* está ampliamente distribuido en *S. enterica*, a consecuencia de su localización en integrones de clase 1 (ver apartado 5.b.1). El gen *sul2* se detectó también en numerosos serotipos: Enteritidis, Choleraesuis, Typhimurium, Hadar y Virchow, entre otros (Chen *et al.*, 2004; Randall *et al.*, 2004; Daly *et al.*, 2005; Michael *et al.*, 2006), a menudo junto con los genes *strA* y *strB*, de resistencia a estreptomycin. Por último, el gen *sul3*, recientemente descubierto en *Escherichia coli* (Perreten y Boerlin, 2003), ya ha sido detectado en Agona, Brandenburg, Typhimurium y su variante monofásica [4,5,12:i:-] y en Choleraesuis (Guerra *et al.*, 2004b; Chiu *et al.*, 2005).

Resistencia a quinolonas y fluoroquinolonas: en *Salmonella* la resistencia a quinolonas fue en principio atribuida a mutaciones puntuales en el gen *gyrA*, que codifica para la subunidad A de la ADN-girasa y es la diana primaria de las quinolonas. Los cambios en los aminoácidos Ser-83 (a Phe, Tyr o Ala) o Asp-87 (a Gly, Asn o Tyr) son las mutaciones más frecuentes observadas en cepas resistentes a ácido nalidíxico. Incluso se han encontrado aislamientos de *S. Typhimurium* DT104 que presentan ambas mutaciones (Guerra *et al.*, 2003). Estas cepas fueron aisladas entre los años 1991 y 1995 de muestras animales y humanas, en áreas limitadas de Europa y mostraron niveles altos de resistencia a ciprofloxacino. La doble mutación resultó idéntica en diferentes aislamientos (Ser-83 a Ala y Asp-87 a Asn), que además tenían alterados otros dos genes: *gyrB*, que codifica para la subunidad B de la ADN-girasa (cambio de Ser-464 a Phe) y *parC*, que codifica la subunidad ParC de la topoisomerasa IV, diana secundaria de quinolonas y fluoroquinolonas

(cambio de Ser-80 a Ile). Dichas cepas presentaban niveles muy altos de resistencia a ciprofloxacino, fluoroquinolona de elección en el tratamiento de infecciones causadas por *S. enterica*. Trabajos posteriores pusieron de manifiesto la emergencia de resistencias similares en otros aislamientos de Typhimurium, así como en Cholerasuis y Schwarzengrund (Michael *et al.*, 2006).

5.b. Elementos genéticos implicados en la dispersión de la resistencia

En la dispersión de la resistencia a agentes antibacterianos desempeñan un papel fundamental los EGMs, también denominados unidades de captura génica (UCGs), entre los que destacan el sistema integrón-caseta génica, los transposones, los plásmidos y las islas genómicas (Canton *et al.*, 2003; Baquero, 2004; Miriagou *et al.*, 2006).

5.b.1. Integrones

Los **integrones** son sistemas naturales de clonación y expresión que incorporan ORFs y las convierten en genes funcionales (Carattoli, 2001). Están formados por una integrasa (*intI*) que media en la recombinación entre el sitio de recombinación primario *attI* y el secundario *attC*. Este último se encuentra asociado normalmente a una única ORF y la estructura *attC*-ORF se denomina caseta génica. La inserción de una caseta génica en el sitio *attI*, permite su expresión a partir de un promotor fuerte, que solapa con el gen *intI* (Fig. 13).

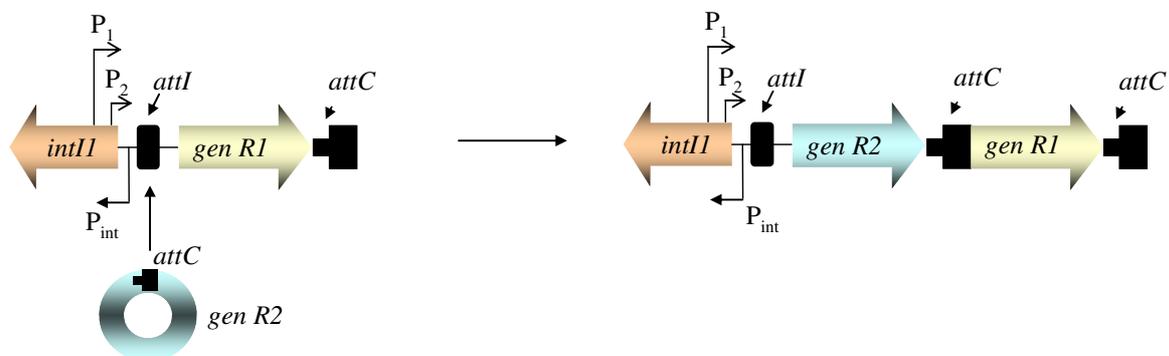


Figura 13. Inserción de casetas génicas en integrones (Carattoli, 2001)

Dependiendo de la naturaleza de las casetas génicas, los integrones se clasifican actualmente en dos grupos (Fluit and Schmitz, 2004): integrones de resistencia (RI) y superintegrones (SI). Los primeros contienen fundamentalmente genes de resistencia a antimicrobianos y pueden encontrarse en transposones, plásmidos o en el cromosoma bacteriano (apartados 5.b.2 y 5.b.3). Los segundos,

de mayor tamaño, se localizan en el cromosoma y contienen casetes génicas con una gran variedad de funciones.

Integrones de resistencia (RI)

En base a la secuencia de aminoácidos de las integrasas, cuya homología varía entre el 39 y el 58%, se han establecido tres clases de RIs, que pueden localizarse en el cromosoma bacteriano o en plásmidos. Hasta la fecha, sólo las clases 1 y 2 se han encontrado en *S. enterica* (Carattoli, 2001; Rowe-Magnus *et al.*, 2001; Rowe-Magnus y Mazel, 2002; Rowe-Magnus *et al.*, 2002).

Los integrones de **clase 1** fueron los primeros en describirse, son los mejor caracterizados y los más ampliamente distribuidos dentro de bacterias patógenas Gram negativas que infectan al hombre y animales, incluyendo los diferentes serotipos de *S. enterica* (Guerra *et al.*, 2000a; Carattoli, 2001). Constan de un segmento conservado, correspondiente al extremo 5' (5'CS) del integrón, que contiene el gen *intI1*, que codifica para la integrasa. Un segundo segmento conservado, localizado en el extremo 3' (3'CS), generalmente contiene el gen *qacEΔ1*, delección funcional del gen *qacE1*, que confiere resistencia a antisépticos y desinfectantes; el gen *sul1*, que lo hace a sulfonamidas y una pauta de lectura abierta *orf5* de función desconocida (Fig. 14).

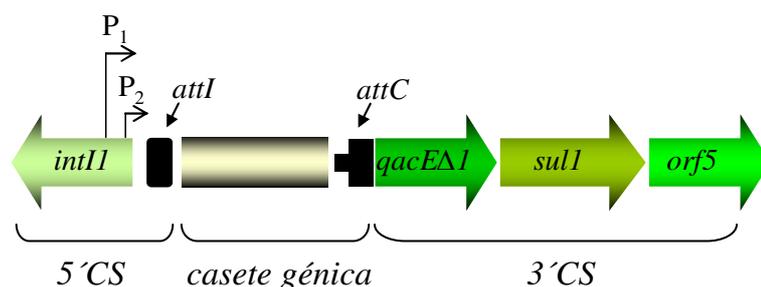


Figura 14. Esquema de un integrón de clase 1 (Levesque *et al.*, 1995)

Las casetes génicas de resistencia a antibióticos, se encuentran insertadas en el sitio *attI*, entre los segmentos 5'CS y 3'CS, dando lugar a la región variable (RV) (Recchia y Hall, 1995; Carattoli, 2001). De manera global, se han identificado hasta el momento más de 60 casetes génicas. Sin embargo, cada RI individual sólo incluye de cero (RI vacío) a diez casetes, pudiendo encontrarse en gran variedad de bacterias diferentes.

Un subgrupo de integrones de clase 1, denominados complejos o elementos ISCR, contienen además una región CR (Región Común), seguida de genes (sin estructura casete) que

codifican resistencia a una gran diversidad de agentes antimicrobianos, todo ello flanqueado por dos copias, una truncada y otra completa, del segmento 3'CS. (Toleman *et al.*, 2006).

Los **integrones de clase 2** son menos frecuentes que los anteriores y sólo se ha descrito en contadas ocasiones en *Salmonella* (Orman *et al.*, 2002; Miko *et al.*, 2003; Rodríguez *et al.*, 2006a, b). Estos integrones no presentan el segmento 3'CS, pero la estructura del segmento 5' es similar al encontrado en los de clase 1. Sin embargo, el gen *intI2*, que codifica la integrasa, no es funcional ya que presenta un codón interno (TAA) de terminación de la traducción. Al igual que en los integrones de clase 1, el promotor y el sitio de integración (*attI2*) se encuentra entre el gen de la integrasa (*intI2*) y la primera casete génica integrada. Típicamente, los integrones de clase 2 contienen tres casetes génicas: *dhfrA1*, *sat1* y *aadA1*, que confieren resistencia a trimetoprim, estreptotricina y estreptomycin-espectinomicina (Hansson *et al.*, 2002). Los **integrones de clase 3**, cuya estructura es similar a los de clase 1, aún no se han encontrado en *S. enterica*.

Superintegrones (SI)

Se encontraron inicialmente en *Vibrio* y posteriormente en otros muchos géneros bacterianos. Los SI, inicialmente designados integrones de clase 4, presentan importantes diferencias con los RI: sólo se han detectado en el cromosoma, uno de ellos puede contener más de 100 casetes génicas con diferentes funciones, incluida la resistencia a antimicrobianos y, en general, existe especificidad a nivel de especie. Actualmente se piensa que los RI proceden de los SI (Fluit y Schmitz, 2004).

5.b.2. Transposones

Los transposones son EGMs que poseen la maquinaria necesaria (enzima transposasa y proteínas reguladoras) para promover su propia translocación desde un sitio donador a un sitio receptor, sin necesidad de homología entre ambos. Contienen, además, genes accesorios, que pueden conferir resistencia a agentes antimicrobianos (Kleckner, 1981). En bacterias patógenas Gram negativas tres tipos de transposones desempeñan un papel fundamental en la dispersión de la resistencia y algunos contribuyen eficazmente a la movilidad de los integrones.

Transposones compuestos o de clase 1: en éstos, un segmento de ADN, que normalmente contiene genes de resistencia a antimicrobianos, queda delimitado por dos copias idénticas o casi idénticas de una misma secuencia de inserción. Las secuencias de inserción (ISs) son los elementos genéticos transponibles más sencillos y de menor tamaño (750 a 1500 pb), se encuentran flanqueadas por repeticiones invertidas (IRs) y sólo contienen genes implicados en el proceso de

transposición. En los transposones compuestos, una o ambas ISs aportan la maquinaria enzimática y las IRs requeridas para la movilidad del elemento. Un ejemplo de transposón compuesto es Tn10 (Fig. 15), de 9,2 Kb, en el cual dos copias de la secuencia de inserción IS10 (IS10-L e IS10-R) han englobado genes de resistencia a tetraciclina y a otros agentes antimicrobianos *tet(B)*, *tetR*, *tetC* y *tetD*, junto con genes de función desconocida. Un segundo ejemplo lo constituye el transposón Tn9 (2,62 Kb), que consta de un gen de resistencia a cloranfenicol (*catA1*), flanqueado por dos copias de IS1 (IS1a e IS1b).

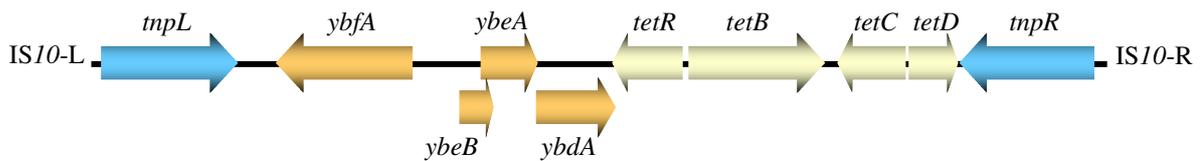


Figura 15. Esquema del transposón Tn10 (AP005147)

Transposones de clase 2 o Familia Tn3: es probablemente el grupo mayoritario de elementos genéticos transponibles, encontrándose ampliamente distribuido en el mundo bacteriano. Los transposones de esta familia son de tamaño relativamente grande, se encuentran flanqueados por repeticiones terminales invertidas (IRs) de 38-40 pb, contienen genes (*tnpA* y *tnpR*, que codifican los enzimas transposasa y resolvasa) y sitios (*res*, además de las IRs) implicados en la transposición, junto con genes accesorios. La transposición ocurre en dos etapas. En la primera TnpA promueve la formación de un cointegrado entre la molécula donadora y la molécula receptora. Durante esta etapa tiene lugar la replicación del transposón y de cierto número de nucleótidos (en concreto cinco) presentes originalmente en el sitio de inserción. En la segunda etapa TnpR resuelve el cointegrado, mediante un proceso de recombinación específica de sitio entre las secuencias *res* de cada una de las copias del transposón. Este mecanismo se denomina transposición replicativa.

El transposón **Tn21** (Fig. 16) y sus derivados son miembros de la familia del **Tn3**, que colabora activamente en la diseminación global de la resistencia en bacterias. Tn21 (de 19,7 Kb), posee los genes (*tnp*) y sitios (IRs y *res*) necesarios para la transposición, así como genes que confieren resistencia a diversas clases de antimicrobianos. Entre estos últimos se incluye el operón *mer*, cuyos productos intervienen en la detoxificación de compuestos mercuriales orgánicos e inorgánicos. Además, Tn21 contiene un integrón de clase 1, denominado In2, en cuya región VR se encuentra la casete génica *aadA1*, que codifica una aminoglicósido adenil transferasa (resistencia a

estreptomomicina y espectinomomicina). In2 posee, además, un módulo *tni* defectivo (genes *tniBΔ1* y *tniA*) que se encuentra flanqueado IRs terminales de 25 pb, tratándose probablemente de un transposón vestigial. Finalmente, entre ORF5 (del segmento 3'CS de In2) y el módulo *tni* se localizan dos secuencias de inserción: IS1326 e IS1353.

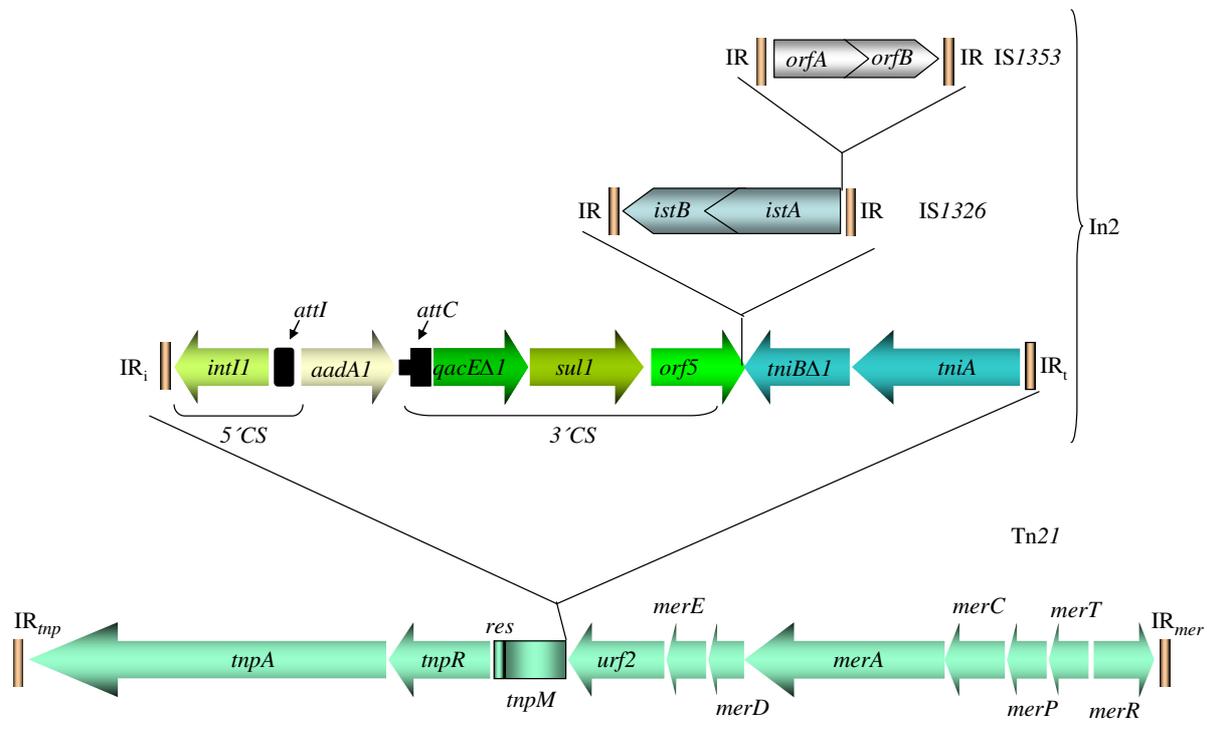


Figura 16. Esquema del transposón Tn21 (Liebert *et al.*, 1999)

Transposones de clase 4. Esta clase puede considerarse como “cajón de sastre” donde se incluyen transposones con características peculiares. Uno de ellos es Tn7 (14 Kb), responsable de la movilización de los integrones de clase 2. Tn7 utiliza el mecanismo de transposición conservativa, que implica la pérdida del transposón del sitio donador al trasladarse al sitio receptor.

Un hecho crucial en la dispersión de la resistencia es la agrupación de genes R individuales, transposones y/o integrones en bloques denominados **islas de resistencia**, que pueden localizarse en el cromosoma bacteriano o, más frecuentemente, en plásmidos a menudo conjugativos (Miriagou *et al.*, 2006).

5.b.3. Plásmidos

Los **plásmidos** son elementos genéticos extracromosómicos que tienen capacidad de replicación autónoma, heredándose de forma estable. De manera característica codifican funciones no esenciales para la célula (virulencia, resistencia a antimicrobianos, rutas catabólicas, etc), pero que aportan una ventaja selectiva en determinados ambientes. Algunos portan, además, genes (*tra*) implicados en proceso de **conjugación**. La conjugación es un mecanismo replicativo por el cual el plásmido se transfiere de una bacteria donadora (que mantiene), a otra receptora (que lo adquiere). La transferencia puede ocurrir incluso entre bacterias filogenéticamente distantes, lo cual puede tener importantes consecuencias evolutivas. Los plásmidos pueden también integrarse en el cromosoma y, en este caso, la presencia de la región *tra* puede permitir la movilización de ADN cromosómico entre bacterias. Los plásmidos conjugativos han desempeñado un papel fundamental en la dispersión horizontal de la resistencia a antimicrobianos en bacterias.

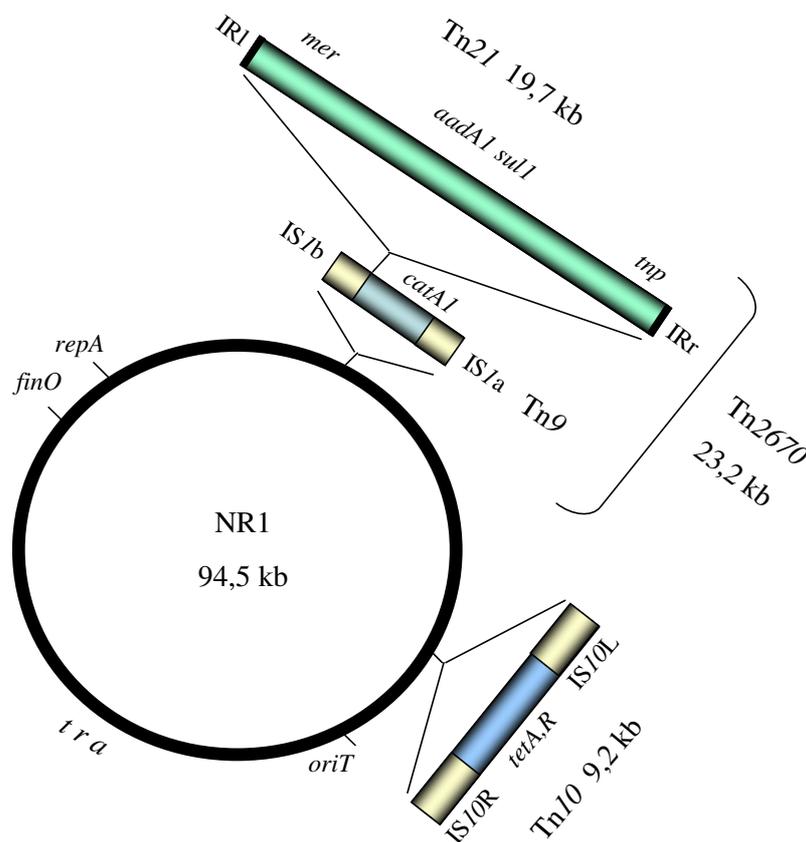


Figura 17. Representación esquemática del plásmido NR1 conjugativo, prototipo de plásmido de resistencia (Liebert *et al.*, 1999)

El **plásmido NR1** (también conocido como R100; Fig. 17) puede considerarse como prototipo de plásmido R conjugativo (Liebert *et al.*, 1999). NR1, de 94,5 Kb, se detectó por primera vez en un aislamiento de *Shigella flexneri*, recuperado en Japón a finales de la década de los 50. Plásmidos similares se descubrieron posteriormente en distintos países del mundo. NR1 contiene los genes necesarios para los procesos autónomos de replicación (*rep*) y transferencia (*tra*), junto con distintos elementos implicados en resistencia. Así, en este plásmido, el transposón Tn21, portador de In2, se encuentra insertado en Tn9, quedando el conjunto delimitado por las secuencias de inserción (IS1a e IS1b) de este último. El elemento resultante es un transposón compuesto activo, denominado Tn2670 (Partridge y Hall, 2004). NR1 contiene, además, una copia de Tn10.

5.b.4. La isla genómica 1 (SGI1)

Con un tamaño de 43 Kb, constituye el ejemplo más representativo de isla de resistencia cromosómica descrita en *S. enterica* (Threlfall, 2000; Mulvey *et al.*, 2006). Esta isla se detectó inicialmente en aislamientos del serotipo Typhimurium, fagotipo DT104 resistentes a ampicilina, cloranfenicol/florfenicol, estreptomina, sulfonamidas y tetraciclina. Los aislamientos, identificados inicialmente en Inglaterra, se dispersaron internacionalmente en poco tiempo. SGI1, responsable de la pentarresistencia, contenía dos integrones de clase 1: InC (1000 pb/*aadA2*) e InD (1200 pb/*bla_{PSE-1}*), que además aportaban los genes *sull* y *qacEΔ1*. Los genes *floR* y *tet(G)* se encuentran también en la isla. La localización cromosómica de SGI1 estabiliza a los determinantes de resistencia, incluso en ausencia de presión selectiva. Además, la movilidad de la isla explica su transferencia horizontal interserotipo, ya encontrada en Agona, Albany, Cerro, Derby, Düsseldorf, Emek, Infantis, Kiambu, Meleagridis, Newport y Paratyphi B. Tanto en Typhimurium como en otros serotipos se han identificado variantes de SGI1, con deleciones o inserciones, que alteran el genotipo y fenotipo de resistencia.

6. EPIDEMIOLOGÍA

La salmonelosis tiene una gran importancia epidemiológica. En los últimos años ha habido un aumento progresivo de aislamientos de *Salmonella* de origen humano registrados por los laboratorios de referencia. Este aumento se debe a diferentes factores, entre los que se incluyen: los métodos modernos de procesamiento de alimentos a gran escala y su amplia distribución geográfica, el mayor número de personas con resistencia alterada a la infección, así como un mejor informe de los casos.

No se aprecian diferencias en la frecuencia con que se producen salmonelosis en base al sexo, sin embargo, sí existe una variación en relación a la edad, siendo muy importante la

incidencia observada en niños menores de cinco años y ancianos (Usera *et al.*, 1994, 1995a, b, 1996a, 1997a, b, 1998a, b; González-Hevia *et al.*, 1995a, b, 1999; Echeita *et al.*, 2005a, b, c). Destaca también la mayor probabilidad de contraer la enfermedad en personas inmunodeprimidas y/o con enfermedades crónicas subyacentes, como es el caso de enfermos con SIDA, en los que se registra una mayor incidencia de bacteremias e infecciones focales por *Salmonella* (Vázquez *et al.*, 1994; Rodríguez *et al.*, 1998, 2006d; Morpeth y Thielman, 2006).

En la figura 18 se muestra la distribución a nivel mundial de serotipos de *Salmonella* entre los años 2000 y 2004, según el informe de la plataforma “WHO Global Salm-Surv” de 2005. Esta plataforma fue creada en 2000 por la OMS para el estudio, detección de brotes y control de enfermedades alimentarias, englobando Laboratorios de Referencia, Laboratorios Nacionales y Regionales de Salud Pública y Veterinaria de 142 países. Como se puede ver, en Europa el serotipo mayoritariamente causante de salmonelosis es Enteritidis (75%) seguido por Typhimurium (13%). En tercera y cuarta posición, a una distancia importante, aparecen Hadar y Virchow.

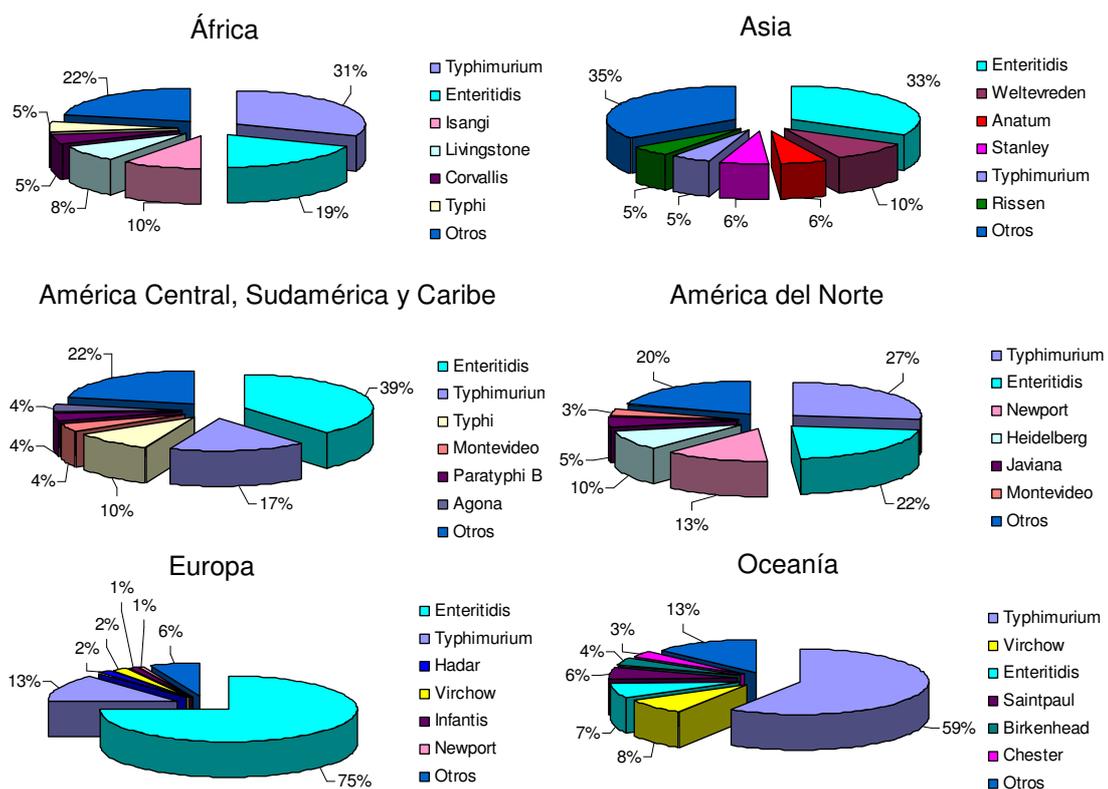


Figura 18. Distribución mundial de serotipos de *Salmonella* aislados en humanos durante el período 2000-2004 (<http://www.who.int/salmsurv/links/GSSProgressReport2005.pdf>)

En España, al igual que en otros países europeos, *S. Enteritidis* fue el serotipo mayoritario, con una incidencia del 43-60% durante el periodo 1997-2005. El valor superior (60%) se observó en los años 2001-2002, descendiendo durante 2003-2005 hasta el 50%, que ya se había alcanzado en 1999. El segundo en frecuencia fue *S. Typhimurium*, con valores del 30% en 1997-1998, que posteriormente disminuyeron hasta el 8,5%. En el periodo 2004-2005 se aprecia un ligero ascenso, hasta el 12%. El tercer lugar fue para *S. Hadar*, apreciándose un descenso paulatino del número de aislamientos asociados a este serotipo, que pasa de representar el 4,7% del total en el año 2000 al 1,9% en 2003. En cuarta y quinta posición, respectivamente, se situaron la variante monofásica de *S. Typhimurium* [4,5,12:i:-], considerada en España como serotipo a efectos de seguimiento epidemiológico, y *S. Virchow*, cuyos aislamientos también disminuyeron ligeramente entre los años 2000 y 2003 (Usera *et al.*, 2001a; Usera *et al.*, 2003a; Echeita *et al.*, 2005a, b; B.E.S. 2004, 2005).

S. Brandenburg y *S. Ohio*, son dos serotipos minoritarios, que junto con *S. Hadar* serán objeto del presente trabajo. En Europa, en el año 2001, el primero se situó en novena posición, mientras que *S. Ohio* no se contabilizó entre los 20 serotipos más frecuentes. En 2002 *S. Brandenburg* se sitúa en la posición 20 y del serotipo *Ohio* no se dispone de datos (http://www.hpa.org.uk/hpa/inter/enter-net_reports.htm). En España, *S. Ohio* ocupaba la sexta posición en 2000, perteneciendo a este serotipo el 1,3% de los aislamientos registrados en el Laboratorio Nacional de Referencia de *Salmonella* y *Shigella* (LNRSSSE), en los dos años posteriores pasó a la séptima y octava, volviendo a la séptima en 2003. El porcentaje de cepas pertenecientes al serotipo *Brandenburg* disminuyó durante el periodo 2000-2003, pasando de ocupar la octava posición y representar el 1% del total en 2000, a no figurar entre los diez serotipos más frecuentes en 2003 (con 0,3% de los aislamientos). En el periodo 2004-2005 no disponemos de datos sobre la incidencia de los serotipos *Ohio* y *Brandenburg* (Usera *et al.*, 2001a; Usera *et al.*, 2003a; Echeita *et al.*, 2005b).

En Asturias durante el período 1990-2006, el Laboratorio de Salud Pública (LSP) de la Consejería de Sanidad (que actúa como Centro Regional de Referencia de *Salmonella*) recibió 9704 aislamientos de esta bacteria, pertenecientes a 86 serotipos. Sin embargo, el número real podría ser muy superior, puesto que no todos los casos se declaran ni en todos ellos se busca el agente causal o se remite al LSP (González-Hevia *et al.*, 1999; M. Bancés y M. A. González-Hevia, comunicación personal). Además, entre 2002-2006 se registraron 87 brotes alimentarios originados por *Salmonella* (45 comunitarios, 41 familiares y uno hospitalario), con un total de 468 personas afectadas (M. Bancés y M. A. González-Hevia, comunicación personal). El mayor número de brotes ocurre en los hogares, aunque también son frecuentes en instituciones con restauración

colectiva, como hospitales, residencias de ancianos, restaurantes-bares, campings, escuelas y guarderías. Alguno de ellos, causados por *S. Virchow* y *S. Hadar*, ocurrieron a nivel nacional (Usera *et al.*, 1996b; Martín *et al.*, 2001; Lenglet, 2005).

Por su parte, el LNRSSE durante el periodo 2000-2003 recibió 2417 cepas de *Salmonella* implicadas en 707 brotes alimentarios, de los cuales 393 fueron familiares y 302 comunitarios, mientras que en los 12 restantes no se especificó el tipo. El serotipo mayoritario fue *S. Enteritidis* (Usera *et al.*, 2001b; Usera *et al.*, 2003b; Echeita *et al.*, 2005c). No obstante, en este periodo, se registraron también brotes causados por alguno de los serotipos objeto de esta tesis (ver Discusión).

Por otro lado, todos los serotipos pueden causar infecciones extraintestinales. En décadas pasadas los serotipos predominantes fueron Choleraesuis, Virchow y Dublin (Goldberg y Rubin, 1988; Lester *et al.*, 1991; Miller y Pegues, 2000). En la actualidad, han sido desplazados por *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* en Europa y USA (Rodríguez *et al.*, 1998, 2006d; Ruiz *et al.*, 2000; Threlfall *et al.*, 2003), aunque *S. Virchow* continúa siendo prevalente en Israel (Yagupsky *et al.*, 2002) y *S. Cholerasesuis* en Asia (Chiu *et al.*, 2004).

Los seres humanos adquieren la infección por *Salmonella* después de la ingestión de alimentos o aguas contaminadas, aunque esta última vía de transmisión es más característica del serotipo Typhi (Graeber *et al.*, 1995; Miller y Pegues, 2000). La infección puede también transmitirse de persona a persona o por vía fecal-oral directa, particularmente en niños y ancianos no autosuficientes.

Las aves de corral y sus productos, sobre todo los huevos, son los vehículos de transmisión más importantes, seguidos de carnes de vaca y cerdo y de productos lácteos. Por último, el comercio internacional de productos agrícolas y los consiguientes cambios en los hábitos de consumo, han facilitado una mayor diseminación de las infecciones por *Salmonella* asociadas con frutas y verduras frescas. La superficie de estos vegetales puede estar contaminada con heces animales o humanas. De la misma manera, la salmonelosis asociada a animales exóticos también va en aumento, causando en algunos países entre un 3-5% de los casos. Está asociada sobre todo a reptiles de los que se estima que un 90% son portadores de *Salmonella*. La exposición a otros animales de compañía, como pájaros, roedores, perros y gatos, constituye otra fuente potencial de salmonelosis.

7. TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN

En la mayor parte de los casos la gastroenteritis por *Salmonella* es una enfermedad de corta duración y localizada. Por ello, no se utiliza el tratamiento con antimicrobianos, aunque es necesario combatir la deshidratación. Las formas graves, incluida la fiebre tifoidea, requieren

ingreso hospitalario, rehidratación y terapia antimicrobiana. El tratamiento es obligado en pacientes con riesgo de sufrir septicemia. En estos casos, los agentes de elección son fluoroquinolonas y cefalosporinas de tercera generación (Connor y Schwartz, 2005; Threlfall *et al.*, 2006).

Por otro lado, las medidas de control de la salmonelosis se basan en la prevención de la aparición de bacterias resistentes y de nuevos casos, mediante vacunas y otras medidas profilácticas. Entre éstas últimas se incluyen:

1. Diagnóstico y tratamiento de portadores crónicos, especialmente manipuladores de alimentos.
2. Lucha contra las fuentes y mecanismos de transmisión, mediante medidas de higiene personal, control microbiológico de aguas de consumo, de animales de granja (principalmente aves y cerdos) y de industrias procesadoras de alimentos, etc.
3. Protección de la población sana mediante vacunas. Actualmente en España hay dos vacunas comercializadas para la profilaxis de la fiebre tifoidea. La primera utiliza el antígeno capsular Vi purificado. Se administra por vía intramuscular y tiene una eficacia del 70%. Proporciona inmunidad protectora durante un mínimo de tres años, momento en que se aconseja la revacunación. La segunda es una vacuna viva atenuada (cepa Ty2 del serotipo Typhi). Es la más utilizada, se administra por vía oral en tres dosis y tiene una eficacia del 67%. Puede proporcionar inmunidad durante cinco-siete años, aunque también se aconseja la revacunación a los tres años como en el caso anterior. En países desarrollados, ambas vacunas están indicadas en viajeros que se desplazan a zonas de alta endemia y trabajadores de laboratorio. El desarrollo de vacunas efectivas frente a la salmonelosis no tifoidea es difícil debido al gran número de serotipos implicados.

El segundo punto importante es el control de la emergencia de cepas resistentes a antimicrobianos, atribuida frecuentemente al mal uso de dichos agentes en el tratamiento de las enfermedades humanas, así como su uso indiscriminado en ganadería y agricultura. La mitad de la producción mundial de antibióticos se destina al uso veterinario para el tratamiento y/o prevención de enfermedades en animales, e incluso, empleándose en el pasado como promotores del crecimiento. De hecho, la aparición de cepas resistentes a determinados antimicrobianos en bacterias de origen clínico estuvo precedida por su utilización en animales. Un ejemplo es el aumento de la resistencia a quinolonas, observada tras la aprobación del enrofloxacino para uso veterinario. A pesar de lo expuesto, el papel de los animales como reservorio de resistencia a antibióticos en infecciones humanas está sujeto a controversia, en marcado contraste con el reconocimiento generalizado de los alimentos como principal vehículo de transmisión de

Salmonella en humanos. Uno de los hechos que explica esta controversia es la falta de evidencias claras a favor de que las bacterias resistentes presentes en animales causan también infecciones en el hombre difíciles de tratar. Además, no todos los fenotipos de resistencia son igual de críticos, de modo que el antimicrobiano al cual la bacteria es resistente no tiene por qué ser el antibiótico de elección en el tratamiento de la infección humana. Otro hecho que contribuye a esta controversia lo componen los estudios que intentan demostrar, por ejemplo, la asociación entre el consumo de fluoroquinolonas y la aparición de resistencias a este antibiótico, puesto que frecuentemente no tienen en cuenta el patrón de resistencias a otros antibióticos y la posibilidad de co-selección por otros agentes. La transmisión dinámica de bacterias resistentes es además muy compleja. No obstante para hacernos una idea del impacto que tiene en la salud pública el uso veterinario de fluoroquinolonas podemos comparar la situación de resistencias a estos agentes en cepas de *Salmonella* de EEUU y del Reino Unido. En EEUU entre los años 1994-1995 de un total de 4008 aislamientos de *S. enterica* solamente se encontró un aislamiento resistente a fluoroquinolonas y 21 a ácido nalidíxico. En este país desde mediados de los años 80 se utilizan fluoroquinolonas en medicina humana (se corresponden con un 7% del total de antimicrobianos empleados) pero su uso no estaba aún aprobado en animales de consumo. En el Reino Unido, donde el uso de fluoroquinolonas en animales de consumo está aprobado desde 1993, la proporción de cepas de Typhimurium resistente a las mismas en humanos aumentó desde el 1% en 1994 al 12% en 1996. Esto parece indicar que el uso en medicina humana de fluoroquinolonas tiene muy poco impacto en la aparición de cepas resistentes mientras que el uso veterinario juega un papel significativamente más importante. Actualmente, las fluoroquinolonas están en la lista de la OMS de antibióticos que deben reservarse para uso en humanos (Bager y Helmuth, 2001).

En 2003 tuvo lugar, en Berlín, “The First International Symposium on the Risk Analysis of Antibiotic Resistance”, con la intención de recopilar información sobre la emergencia y propagación de resistencias a antibióticos en los microorganismos. Resulta interesante recoger las conclusiones de esta reunión (Helmut y Hensel, 2004):

- El uso de antimicrobianos en la producción de animales de consumo es causa de problemas en el tratamiento de infecciones en humanos.
- Comparados con patógenos susceptibles, los microorganismos resistentes causan una mayor morbilidad y mortalidad.
- Efecto particularmente notable en el caso de bacterias zoonóticas.
- La presión selectiva debida al uso de antimicrobianos podría reducirse simplemente mediante una utilización más cuidadosa de los mismos.

- El uso de fluoroquinolonas y cefalosporinas de tercera y cuarta generación debe reservarse para el tratamiento individual de animales y sólo en el caso de patógenos resistentes a otros antibióticos.
- No deberían concederse futuras autorizaciones para la comercialización de cefalosporinas de cuarta generación de uso en medicina veterinaria.

Como conclusión final se puede decir que es necesario reducir/controlar el uso de antimicrobianos en clínica humana y en animales para consumo y mejorar las prácticas de cría, sin olvidar la vigilancia en la preparación y/o comercialización de alimentos de origen animal.

Objetivos

Desde los primeros años de la década de los 90 nuestro grupo de investigación se centró en el estudio de la Epidemiología Molecular de *Salmonella enterica* en el Principado de Asturias. Para ello contamos con la colaboración del Laboratorio de Salud Pública del Principado de Asturias, del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Central de Asturias, y del Laboratorio Nacional de Referencia de *Salmonella* y *Shigella* (Centro Nacional de Microbiología; Instituto de Salud Carlos III). Estos centros proporcionaron la mayoría de los aislamientos de *S. enterica* analizados en este trabajo, así como datos epidemiológicos de interés, avisándonos de alertas que deberían ser objeto de estudios especiales.

Cuando se inicia la presente tesis (septiembre de 2001) ya se habían, o se estaban investigando, diferentes aspectos de la Epidemiología Molecular de los tres serotipos prevalentes en España y Europa, durante la década de los 90: Enteritidis, Thyphimurium y Virchow, así como de otros menos frecuentes pero implicados en brotes o alertas epidemiológicas (serogrupo G, serotipos Panama y Wien), prestando en todos los casos una atención especial a la optimización de marcadores epidemiológicos y al estudio de las bases moleculares de la resistencia a antimicrobianos. En este contexto, como ejes del trabajo, se me asignan estudios paralelos sobre los serotipos Hadar, que a partir de 1996 desplaza a Virchow como tercero en frecuencia en España; y sobre los serotipos Ohio y Brandenburg que fueron objeto de alertas epidemiológicas en 1998 y 2000, respectivamente.

Por conveniencia, dirigida a presentar una exposición coordinada de los resultados y su discusión, los aspectos estudiados se han agrupado en cuatro objetivos.

- Objetivo 1.** Epidemiología Molecular de *S. enterica* serotipo Hadar en el Principado de Asturias.
- Objetivo 2.** Epidemiología Molecular de *S. enterica* serotipo Brandenburg en el Principado de Asturias.
- Objetivo 3.** Epidemiología Molecular de *S. enterica* serotipo Ohio en el Principado de Asturias.

En cada uno de estos objetivos se abordaron los siguientes estudios:

- Impacto epidemiológico durante los años 1995-2004 (*S. Hadar*), 1993-2005 (*S. Brandenburg*) y 1991-2005 (*S. Ohio*). Identificación de los tipos o grupos genómicos prevalentes y endémicos, esporádicos y/o implicados en alertas epidemiológicas. Relación con datos epidemiológicos a nivel nacional e internacional.
- Resistencia a agentes antimicrobianos. Perfiles-R, genes y elementos genéticos implicados.

Objetivo 4. Perfiles de genes de virulencia en aislamientos de los serotipos Hadar, Brandenburg y Ohio.

En este apartado se analizaron genes asociados y no asociados a islas de patogenicidad y se investigó la correlación entre perfiles de virulencia y distintos tipos de infecciones causadas por estos tres serotipos en el Principado de Asturias.

Material y Métodos

I. AISLAMIENTOS DE SALMONELLA. PROCEDENCIA Y CULTIVO

Se analizaron un total de 172 aislamientos de *S. enterica* implicados en distintos episodios de salmonelosis, durante 1991-2005 (Anexo I). Estos aislamientos habían sido registrados por el LSP del Principado de Asturias como procedentes de muestras clínicas recogidas en las áreas sanitarias I (Jarrio; 11 aislamientos), II (Cangas de Narcea; 9), III (Avilés; 26), IV (Oviedo; 44), V (Gijón; 77), VI (Arriondas; 5), VII (Mieres; 1) y VIII (Riaño; 3). Además, fueron asignados a los serotipos Hadar (serogrupo C; 84 aislamientos), Brandenburg (serogrupo B; 34 aislamientos) y Ohio (serogrupo C; 54 aislamientos) por el LNRSSE.

Como controles o fuera de grupo se utilizaron dos aislamientos procedentes de aguas residuales (uno de *S. Brandenburg* y otro de *S. Ohio*) y dos procedentes de muestras cárnicas (ambos de *S. Brandenburg*), así como las cepas de colección *S. Typhimurium* ATCC 14028 (serogrupo B), *S. Enteritidis* ATCC 13076 (serogrupo D) y *S. Braenderup* H9812 (serogrupo B).

Las bacterias conservadas en el LSP fueron reaisladas a partir de cultivos congelados o liofilizados mediante siembra en placas de agar sangre (Oxoid) que se incubaron a 37°C durante 24 horas. Colonias aisladas procedentes de cada aislamiento se pasaron a medio selectivo y diferencial para *Salmonella* (EH). De éste se tomaron colonias no fermentadoras de lactosa y se inocularon en caldo Luria-Bertani (LB), utilizándose una parte de este cultivo para el análisis y volviéndose a congelar otra para conservar en nuestro laboratorio. La congelación se llevó a cabo transfiriendo una población densa de las bacterias a caldo LB con glicerol al 30%. La suspensión obtenida se mantiene a -20°C y/o -70°C hasta su utilización.

Los medios de cultivo utilizados durante la realización del trabajo fueron los siguientes:

- Caldo LB: 10 g de triptona, 10 g de cloruro sódico, 5 g de extracto de levadura, agua destilada hasta 1 l y pH final de 7,0.
- Agar Luria-Bertani (LA): medio sólido que consiste en LB al que se le añaden 20 g/l de agar antes de su esterilización.
- Agar Mueller Hinton (MH): medio comercial de Oxoid. Preparado según instrucciones de la casa comercial.

Los medios anteriores se esterilizaron en autoclave a 121°C y 1 atmósfera de presión durante 20 minutos.

- Agar EH: se preparó según instrucciones del fabricante (Oxoid) y se esterilizó por calentamiento a 80°C durante 45 minutos, evitando la ebullición. Una vez repartido en las placas, éstas se someten a luz U.V. durante 15 minutos.

- Agar EMB. Se preparó siguiendo las instrucciones de la casa comercial (Pronadisa) y se esterilizó de forma similar al medio EH.

2. ANÁLISIS FENOTÍPICO DE LA SENSIBILIDAD-RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS

Este parámetro se midió utilizando el método de difusión disco-placa siguiendo las recomendaciones del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), anteriormente NCCLS (NCCLS, 2005). La técnica consiste en sembrar en superficie placas de agar MH con 100 µl de una dilución 1/1000 del cultivo de una noche. Tras dejar secar las placas se colocan los discos de antibióticos (Oxoid) con una separación mayor de 2,5 cm (Fig. 19). Los antimicrobianos utilizados así como sus cantidades en microgramos se encuentran recogidos en la tabla 2. Los perfiles de resistencia para los antimicrobianos ensayados se valoraron interpretando el diámetro de los halos según tabla 2.



Figura 19. Antibiograma según el método de difusión disco-placa. S: sensible, R: resistente

Tabla 2. Antimicrobianos y categorías de sensibilidad-resistencia (NCCLS, 2005)

Antibiótico	Carga disco (µg)	R (mm)	I (mm)	S (mm)	Antibiótico	Carga disco (µg)	R (mm)	I (mm)	S (mm)
NAL	30	≤13	14-18	≥19	GEN	10	≤12	13-14	≥15
AMP	10	≤13	14-16	≥17	KAN	30	≤13	14-17	≥18
CEF	30	≤14	15-17	≥18	SUL	300	≤12	13-16	≥17
CIP	5	≤15	16-20	≥21	TET	30	≤14	15-18	≥19
CHL	30	≤12	13-17	≥18	TMP	5	≤10	11-15	≥16
STR	10	≤11	12-14	≥15	SXT	1,25 /23,75	≤10	11-15	≥16

R, resistente; I, intermedio; S, sensible

La concentración mínima inhibitoria (CMI) para CEF y CIP se determinó en medio LB con diluciones seriadas de 4 a 128 y de 0,125 a 4 µg/ml, respectivamente. Los resultados se interpretaron de acuerdo con los criterios del CLSI (NCCLS, 2005).

Los antimicrobianos utilizados se escogieron en base a dos criterios, por un lado se usaron aquellos recomendados por el CLSI para análisis rutinarios de *S. enterica* en laboratorios clínicos microbiológicos y por otro aquellos que clásicamente han sido utilizados como marcadores epidemiológicos. Entre los primeros se emplearon AMP, CEF, CIP, CHL, GEN, KAN, SUL, TET, TMP Y SXT. Como marcadores epidemiológicos clásicos se usaron: NAL y STR.

3. ANÁLISIS GENOTÍPICOS

3.a. Métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

3.a.1. Protocolo de la amplificación mediante PCR

Para llevar a cabo la amplificación por PCR se usó como fuente de ADN molde 2-5 µl de un cultivo en caldo LB de una noche de la cepa que se desea analizar, sin ningún tratamiento de extracción previo. Los reactivos necesarios son los oligonucleótidos, que actuarán como iniciadores de la reacción de síntesis y que son complementarios a una región de la secuencia a amplificar, los cuatro desoxirribonucleótidostrifosfato (dNTPs), un enzima ADN polimerasa termorresistente y el tampón. La concentración de cada uno de estos componentes se especifica en la tabla 3.

Tabla 3. Reactivos y concentraciones utilizados en la PCR

<i>Reactivos</i>	<i>Concentración</i>	<i>Casa comercial</i>
Oligonucleótidos	1 µM	Sigma Genosys
dNTPs	0,2 mM (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)	GE Healthcare
Tampón (PCR Buffer×10)		
Tris HCL pH 8,8	10 mM	
MgCl ₂	1,5 mM	Finnzymes OY
KCl	50 mM	
Triton X-100	0,1%	
ADN polimerasa (DyNAzyme II DNA polymerase)	2 U	Finnzymes OY

En el anexo II se recogen los iniciadores empleados en esta tesis, así como el tamaño de los amplicones resultantes.

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Gene Amp PCR System (Perkin-Elmer, modelos 2400 o 9700), donde se programan las distintas etapas del proceso:

Desnaturalización: se produce la separación de las dos hebras de ADN por acción de la temperatura; **anillamiento:** tiene lugar el apareamiento de los iniciadores con secuencias homólogas del ADN molde; **extensión:** la ADN polimerasa sintetiza la hebra complementaria uniéndose al iniciador e incorporando dNTPs. Este último ciclo se repite un número determinado de veces (entre 30 y 35) con las cadenas recién sintetizadas actuando, también, como molde. De esta manera se consigue un incremento exponencial del número de copias del fragmento de ADN delimitado por los iniciadores (Fig. 20).

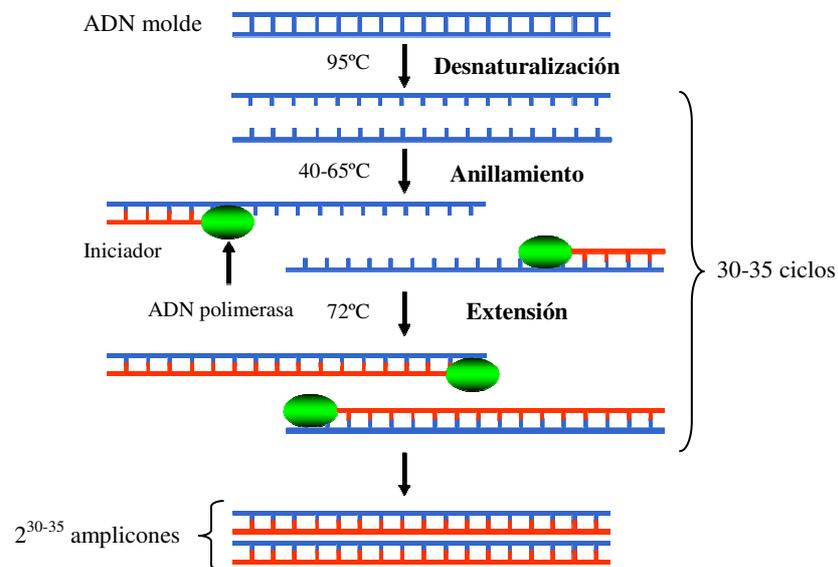


Figura 20. Etapas de la amplificación basada en la PCR

Los productos de la amplificación se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5% en tampón TAE (Tris-Acetato 40 mM pH8-EDTA 1 mM). Posteriormente, los geles se tiñeron con una solución de Bromuro de Etidio a 10 mg/ml. Los fragmentos amplificados se visualizaron en un transiluminador de luz UV (300 nm de longitud de onda; Fig. 21).

Para valorar la reproducibilidad del número y tamaño de los fragmentos amplificados y confirmar los resultados, los ensayos se repitieron un mínimo de tres veces. En todos los casos se incluyeron las cepas de colección Typhimurium ATCC 14028 y Enteritidis ATCC 13076, así como una cepa prevalente del serotipo en estudio.



Aislamiento de *Salmonella* a 37°C
en medio sólido diferencial (EMB)



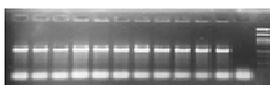
Resiembra de una colonia en medio
líquido (LB) toda la noche a 37°C



Mezcla de los componentes de la reacción
Cultivo, Tampón, dNTPs, iniciadores y ADN-polimerasa



Reacción de amplificación



Separación del ADN por electroforesis en gel de agarosa
Tinción y visualización

Figura 21. Pasos básicos del protocolo de PCR

3.a.2. Variantes de la amplificación mediante PCR

En función de la secuencia amplificada distinguimos dos variantes de esta técnica empleadas en tipificación: la amplificación de secuencias conocidas (monocopia o multicopia) y la amplificación de secuencias aleatorias (generalmente multicopia). En el presente trabajo se utilizaron ambas variantes, con objetivos diferentes.

Amplificación de secuencias conocidas. Se rastrearon secuencias correspondientes a genes que codifican factores implicados en virulencia, resistencia a antimicrobianos, así como genes o secuencias de diferentes tipos de integrones y transposones. Para ello se utilizaron iniciadores específicos de 20 a 30 bases, algunos propuestos por otros autores y otros diseñados en nuestro laboratorio a partir de secuencias depositadas en bases de datos.

Amplificación de secuencias arbitrarias, RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).

En esta técnica los productos de amplificación son secuencias aleatorias cuya función se desconoce. Se utiliza un único iniciador por reacción, de 10 a 15 bases, lo que permitirá, por azar, comenzar la amplificación en uno o más puntos desconocidos del ADN cromosómico. En este método de tipificación, el número y tamaño de fragmentos obtenidos a partir de cada aislamiento definen su perfil-RAPD, pudiendo compararse los correspondientes a distintos aislamientos (Williams *et al.*, 1990; Soto *et al.*, 1999).

Esta técnica es simple y rápida. Sin embargo es necesario encontrar el o los iniciadores adecuados para generar perfiles bien definidos, diferenciables entre sí, reproducibles y útiles para comparar resultados de diferentes series, sin olvidar la optimización de las condiciones.

Las condiciones de amplificación utilizadas en cada una de las dos variantes se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Condiciones de la reacción de amplificación

<i>Variantes</i>	<i>Desnaturalización inicial</i>	<i>Amplificación</i>	<i>Elongación final</i>
<i>Integrones-transposones</i>		30 ciclos	
<i>Genes de resistencia</i>	1 ciclo 94°C 5 min	94°C 30 s T _m *°C 1 min 72°C 1 min	1 ciclo 72°C 5 min
<i>Genes de virulencia</i>			
	2 ciclos 94°C 4 min	35 ciclos 94°C 30 s	1 ciclo
<i>RAPD-tipificación</i>	35°C 2 min 72°C 2 min	35°C 1 min 72°C 2 min	72°C 5 min

*T_m (Temperatura de anillamiento): depende de cada par de iniciadores y se indica en el anexo II

3.a.3. PCR-RFLP

Para el rastreo de los genes que codifican las integrasas de clase 1, 2 y 3 se empleó el protocolo descrito por White *et al.* (2001). En primer lugar se realizó una PCR empleando oligonucleótidos degenerados (Hep35 y Hep36, Tabla II.b), que se unen a regiones conservadas de los genes de los tres tipos de integrasas *intI1*, *intI2* e *intI3*. Los amplicones obtenidos se purificaron con el kit GFXTM DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare) y se digirieron con 8 U del enzima de restricción *HinI* (Takara Bio Inc.) a 37°C, en un volumen final de 20 µl. Los fragmentos se separaron en geles de agarosa al 2%. El gen de la integrasa *intI1* carece de sitios de corte para el

enzima empleado, de forma que la visualización de un único fragmento de 491 pb indica la presencia de esta integrasa. Por el contrario, perfiles de 300 pb y 192 pb o de 119 pb y 372 pb, corresponden a *intI2* e *intI3*, respectivamente. Estos genes contienen un sitio de reconocimiento para *HinfI*, en posiciones diferentes.

3.b. Macrorrestricción con *XbaI* y *BlnI* y electroforesis en campo pulsante

El polimorfismo del ADN de los aislamientos se analizó mediante el estudio de los fragmentos de restricción de su genoma generados con una endonucleasa de baja frecuencia de corte (*XbaI* y *BlnI*) y su posterior separación por electroforesis en campo pulsante (“Pulsed Field Gel Electrophoresis”, PFGE; Fig. 22).

Cultivo.- la cepa a estudiar se inocula en 4 ml de LB y se incuba a 37°C en estático durante 7 horas. Este cultivo se vierte en una placa de LA para conseguir un crecimiento en sábana después de una noche a 37°C.

Preparación de los bloques de agarosa.- Este paso resulta clave en una técnica que requiere la obtención del ADN intacto. A partir del cultivo en placa de la noche anterior se van a realizar suspensiones en tampón PBS (Na_2HPO_4 8 mM- $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ 2 mM-NaCl 0,4 M; pH 7,2) con una absorbancia de 1,0 a 610 nm. A una alícuota de estas suspensiones se le añadirá lisozima (Roche Diagnostics), proteinasa K (Roche Diagnostics), SDS (GE Healthcare) (concentraciones finales de 0,4 mg/ml; 0,4 mg/ml; 0,5%, respectivamente) y agarosa de bajo punto de fusión al 1,2% (Seakem Gold Agarose, Cambrex). Una vez solidificada la agarosa, los bloques obtenidos se introducen en una solución con EDTA (Merck), N-laurilsarcosina (GE Healthcare) y proteinasa K (0,5 M pH8, 1%, 1 mg/ml, respectivamente). El empleo de estos agentes antes y después de la obtención de los bloques garantiza la lisis celular así como la eliminación de enzimas que podrían degradar el ADN.

Lavados de los bloques.- En total se llevan a cabo 5 lavados a 50°C, el primero de ellos con agua milliQ, al que siguen 4 con TE (TrisHCl 10 mM, pH8-EDTA 1 mM). Los bloques así obtenidos se pueden conservar en TE a 4°C hasta su utilización.

Digestión del ADN en los bloques de agarosa.- Tras los sucesivos lavados, los bloques, que contienen ADN de gran pureza y sin fragmentar, se digieren directamente con 30 U del enzima

de restricción seleccionado: *Xba*I (5'-TCTAGA-3') o *Bln*I (5'-CCTAGG-3'), (ambos de Takara Bio Inc.), durante 4 horas a 37°C.

Electroforesis.- Una vez finalizada la digestión, los bloques se funden a 68°C. De esta forma se puede cargar el ADN digerido en un gel de agarosa al 1,2% con TBE 0,5x (Tris 10mM-Borato 45 mM pH8-EDTA 1 mM). Las condiciones empleadas en la electroforesis fueron las consenso para *Salmonella*, recogidas en Peters *et al.* (2003): pulso inicial de 2 s; pulso final de 64 s; 20 horas de corrido; temperatura 14°C; 200 V; ángulo de 120°. Como control de tamaño molecular se utilizó el marcador λ ladder (New England Biolabs) y el ADN de la cepa de referencia Braenderup H9812 digerido con *Xba*I (Hunter *et al.*, 2005). La electroforesis se llevó a cabo en CHEF-DR ® III System (BIO-RAD) y la tinción y visualización del gel se realizó del mismo modo que en electroforesis clásicas.

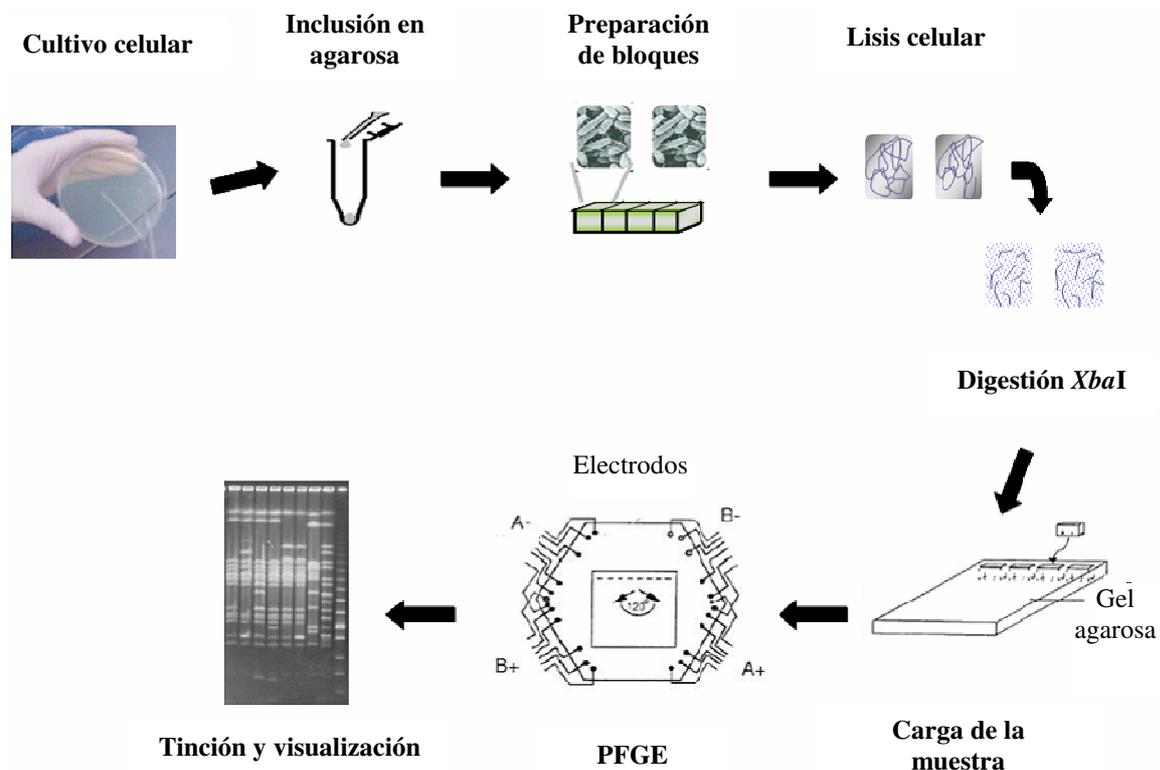


Figura 22. Esquema de la electroforesis en campo pulsante (PFGE)

Reproducibilidad.- Para comprobar la reproducibilidad de la técnica, la tipificación de cepas representativas de los diferentes perfiles de macrorrestricción genómica se repitió al menos dos veces.

Determinación de los tipos genéticos.- Cada perfil definitivo se nombró con una letra (X o B, dependiendo de la endonucleasa utilizada) seguida de un número arábigo. El análisis de convergencia genética entre perfiles se llevó a cabo de forma manual, codificando como 1 o 0 la presencia o ausencia de bandas, sin tener en cuenta su tamaño (Millemann *et al.*, 1995). Con los datos resultantes se generó una matriz. Esta se utilizó para construir un dendograma entre perfiles, aplicando el coeficiente de similitud (S) de Jaccard (JC) incluido en el programa MVSP (Multivariate Statistics Package for PCs) (RockWare Inc^R, <http://www.rockware.com>). Este coeficiente expresa la proporción de fragmentos de ADN no compartidos entre dos perfiles y se calcula aplicando la fórmula:

$$JC_{xy} = a / (a + b + c)$$

a = número de bandas comunes a los dos perfiles
b = número de bandas presentes en **x** pero no en **y**
c = número de bandas presentes en **y** pero no en **x**

3.c. Análisis de plásmidos

3.c.1. Extracción y visualización

La obtención de plásmidos, tanto a partir de los aislamientos de *Salmonella* como de los transconjugantes de *E. coli*, se consiguió mediante el método de lisis alcalina (Sambrock y Russell, 2001). Además, los plásmidos de gran tamaño se visualizaron por tratamiento con nucleasa S1 seguido de PFGE (Barton *et al.*, 1995). En este último caso, el ADN contenido en bloques de agarosa se digiere con 7 U de nucleasa S1 (Takara Bio Inc.), durante 45 minutos a 37°C. Tanto las condiciones de preparación de los bloques como las de electroforesis son similares a las descritas en el apartado 3.b. Con esta técnica conseguiremos linealizar los plásmidos y asignarles el tamaño de una forma muy precisa, comparándolos con marcadores apropiados: lambda ladder PFG Marker (λ ladder; New England Biolabs) y ADN de Braenderup H981 digerido con *Xba*I.

3.c.2. Conjugación

Para los experimentos de conjugación se empleó como cepa receptora *E. coli* K12 J53, resistente a rifampicina (RIF), y como donadoras distintas cepas de *Salmonella* resistentes estudiadas en esta tesis.

Las cepas a conjugar se incuban una noche a 37°C en LB. A partir de estos cultivos se hace una dilución 1/100 en caldo fresco y se deja en agitación a 37°C hasta alcanzar una absorbancia de 0,6 a 600 nm de longitud de onda. Seguidamente se mezclan 100 μ l del cultivo de una cepa

donadora y 200 µl del cultivo de la cepa receptora en 1 ml de LB fresco y se incuban toda la noche a 37°C en estático. Tras lo cual se agita el cultivo enérgicamente para separar las células y se siembran 100 µl del mismo en placas de agar EMB (Pronadisa) con dos antibióticos: RIF (50 µg/ml) para seleccionar *E. coli* y otro (a la concentración adecuada) que sea marca de resistencia de la cepa de *Salmonella*. De esta forma sólo crecerán los *E. coli* que hayan incorporado la resistencia de la bacteria donadora. Los transconjugantes obtenidos se analizan mediante antibiograma y amplificación de genes-R, para determinar las resistencias que han adquirido del aislamiento de *Salmonella*.

3.c.3. Transformación

Para los experimentos de transformación se empleó como cepa receptora *E. coli* TG1, susceptible a agentes antimicrobianos, y como donadoras distintas cepas de *Salmonella* resistentes estudiadas en esta tesis. La obtención de células competentes mediante tratamiento con Ca^{2+} y la transformación con ADN plasmídico se realizó según se describe en Sambrook y Russel (2001). El análisis de los transformantes se llevó a cabo en medio LA, suplementado con AMP, STR o TET a la concentración adecuada (100, 50 y 30 µg/ml, respectivamente). La transferencia de genes-R adicionales se comprobó mediante antibiograma y amplificación, como en el apartado anterior.

3.d. Detección de secuencias de ADN por hibridación

Para localizar secuencias específicas en el ADN de los aislamientos en estudio se utilizó el método de Southern (Sambrook y Russel, 2001), que incluye las siguientes etapas (Fig. 23):

Transferencia del ADN a membranas (Southern blotting).- El ADN contenido en geles de agarosa correspondientes a los perfiles plasmídicos y de macrorrestricción genómica, se desnaturaliza, transfiere y fija a una membrana de nylon. El gel se lava sucesivamente con las siguientes soluciones: depurinizante (HCl 0,25 N), desnaturalizante (NaOH 0,5 M-NaCl 1 M) y neutralizante (NaCl 3 M-Tris HCl 0,5 M, pH 8). La transferencia tiene lugar por capilaridad con papel absorbente y peso. Por último, la fijación del ADN a la membrana se consigue exponiéndola a luz ultravioleta durante 2 minutos.

Preparación de la sonda de ADN.- Las sondas se obtuvieron por PCR usando como molde ADN de las cepas control, con oligonucleótidos específicos para cada gen (Anexo II) y con dNTPs marcados con digoxigenina (PCR Dig Labeling Mix, Roche Diagnostics).

Hibridación.- Consta de cuatro etapas. 1. **Prehibridación**, se incuba la membrana en agitación durante 2 horas a 60°C con 25 ml de la solución de prehibridación (SSC 5x-N-

laurilsarcosina 1%-SDS 0,1%-Blocking reagent 1%) según especificaciones de la casa comercial (Roche Diagnostics). 2. **Hibridación propiamente dicha**, la sonda de la secuencia a rastrear así como el ADN del fago lambda digerido con *Pst*I y marcado con digoxigenina, se ponen en contacto con la membrana, después de haberlos desnaturalizado a 100°C durante 10 minutos. Se incuban al menos 2 horas a 60°C. 3. **Detección inmunológica**, se lava la membrana para eliminar la sonda no pegada específicamente al ADN. Posteriormente se incuba con una dilución de anticuerpos “fab antidigoxigenina” conjugados con fosfatasa alcalina (Roche Diagnostics) que se unen a la digoxigenina del ADN sonda. 4. **Revelado**, se realiza mediante fluorescencia con “CDP-Start Detection System”, según especificaciones del fabricante (Roche Diagnostics), y películas Hyperfilm™ (GE Healthcare). En la película autorradiográfica se visualizará una zona oscura en el sitio donde la sonda haya hibridado con un fragmento correspondiente a la secuencia rastreada.

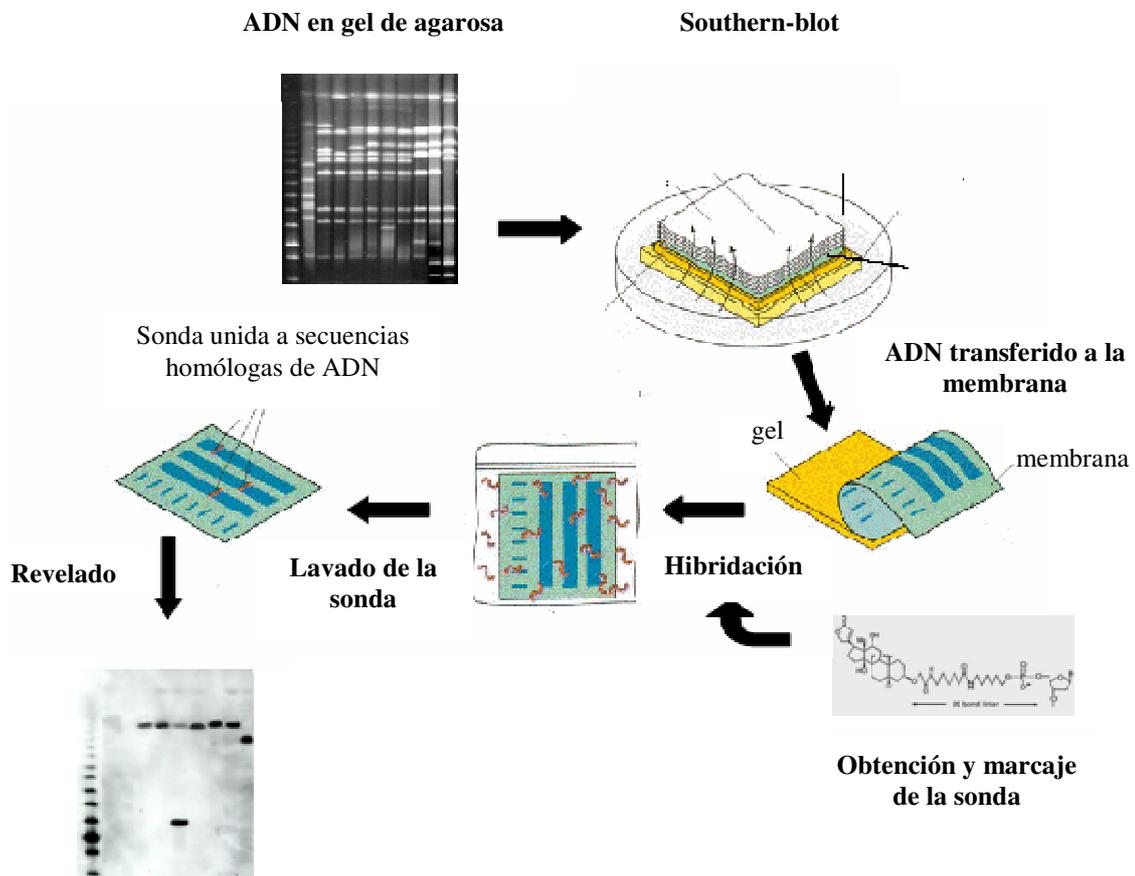


Figura 23. Transferencia de ADN a membranas (“Southern-blot”) e hibridación

(<http://www.biogate.it/microarrays/microarrays.html>, con modificaciones)

3.e. Secuenciación del ADN

La secuenciación de las muestras se llevó a cabo en el Servicio de Secuenciación de la Universidad de Oviedo, con el equipo **ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer**. Se utiliza el método de secuenciación cíclica, que se lleva a cabo en un termociclador, aunque se basa en el método clásico de Sanger, de síntesis interrumpida con dideoxiribonucleótidos (Sanger *et al.*, 1977). Durante el proceso, los fragmentos sintetizados se marcan con fluorescencia y su separación posterior se consigue mediante electroforesis capilar. Los cromatogramas generados se visualizan con el programa Chromas Lite 2.01 (<http://www.techneleysium.com.au>) y las secuencias, una vez corregidas, se analizan con el programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Este último busca homologías, a nivel de secuencia de nucleótidos o aminoácidos, con las depositadas en bases de datos (Altschul *et al.*, 1997).

Resultados

I. Epidemiología molecular de *Salmonella enterica* serotipo Hadar en el Principado de Asturias

I.1. DATOS EPIDEMIOLÓGICOS

Se revisaron los aspectos epidemiológicos de la salmonelosis por *S. Hadar* en el Principado de Asturias, incluyendo la evolución temporal y espacial de los episodios, la presentación clínica y epidemiológica de los casos, así como el sexo y edad de los pacientes afectados. Los resultados quedan recogidos en la tabla I.a (Anexo I).

Durante el periodo de estudio el LSP registró 84 aislamientos de *S. Hadar* (Tabla 5). En el periodo 1995-2001 el número osciló entre siete (año 2000) y 15 (en 1998), para luego disminuir de manera considerable, con sólo uno o dos casos por año durante 2002-2004. El 50% de los aislamientos proceden del área V, mientras que en las áreas VI, VII y VIII la incidencia registrada fue muy baja.

Tabla 5. Dispersión espacial y temporal de los aislamientos de *S. Hadar* en el Principado de Asturias (1995-2004)

Año(s)	Total	Áreas afectadas (nº aislamientos)								Presentación de los casos	
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	Clínica:casos	Epidemiología:casos
1995	13			1	2	10				DA:13	CA:11 BF:2
1996	9			3		5			1	DA:9	CA
1997	9		2	1	1	5				DA:9	CA
1998	15		2	4	2	7				DA:14 O:1	CA
1999	13	1	1	1	5	5				DA:13	CA
2000	7	5				2				DA:6 AB:1	CA
2001	13	2			3	7	1			DA:12 O:1	CA
2002	2				1	1				DA:2	CA
2003	1				1					DA:1	CA
2004	2	1			1					DA:2	CA
1995-2004	84	9	5	10	16	42	1	0	1		

AB: Absceso; O: Orina; DA: Diarrea Aguda

CA: Caso Aislado; BF: Brote Familiar (2 afectados y 2 aislamientos)

En cuanto a la presentación clínica, 81 aislamientos (obtenidos de heces) originaron casos esporádicos de enteritis aguda, dos (procedentes de orina) causaron infecciones urinarias y uno (recuperado de un absceso) se vio implicado en una infección focal, que dos meses después derivó en una enteritis aguda (recuperándose nuevamente la bacteria a partir de heces del paciente). Sólo dos aislamientos (1995, área V) estuvieron involucrados en un brote familiar, con dos afectados con cuadro clínico de enteritis aguda.

En cuanto a la estacionalidad de la salmonelosis por *S. Hadar*, en los meses fríos (noviembre a abril) se registraron 35 episodios y en los cálidos (mayo a octubre) 47, lo que corresponde al 57,3%. Tampoco parecen existir grandes diferencias en función del sexo de los pacientes, con 43 episodios en hombres y 39 en mujeres. Por último, aunque en 12 casos no consta la edad del paciente, en los restantes se observa una mayor incidencia en personas de 14 a 60 años, grupo etario que incluye el 38,6% de los episodios. Otro 27,1% tuvo lugar en niños con edades comprendidas entre los tres y los 13 años. En niños menores de dos años o en adultos mayores de 60, la incidencia fue del 17,1%.

I.2. TIPIFICACIÓN MEDIANTE MÉTODOS GENOTÍPICOS

I.2.a. RAPD

Para la tipificación mediante esta técnica se utilizaron los iniciadores S y C. El primero diferenció un perfil prevalente (S1), presentado por 69 aislamientos (82,1%) y definido por cinco bandas con tamaños comprendidos entre 1.800 y 500 pb, aproximadamente. Los 15 aislamientos restantes mostraron un segundo perfil (S2), en el que no aparece uno de los fragmentos (1100 pb) del perfil prevalente (Fig. 24A).

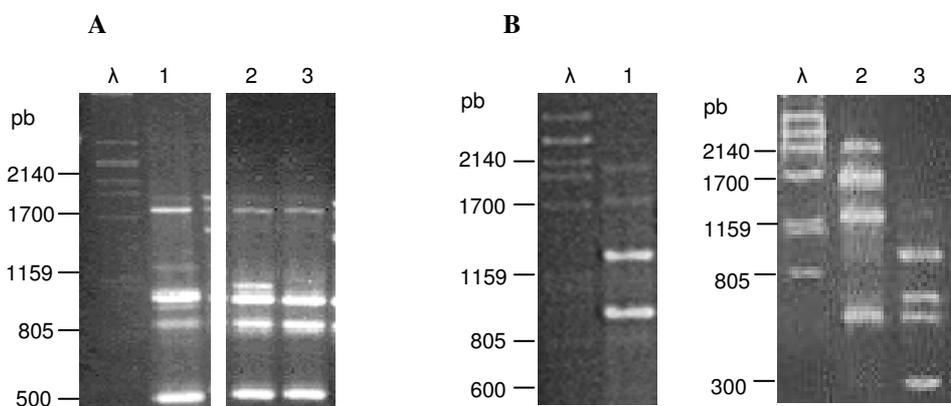


Figura 24. Tipificación RAPD de los aislamientos de *S. Hadar* (A) Perfiles obtenidos con el iniciador S. Calle λ: ADN del fago λ digerido con *PstI*. Calle 1: *S. Typhimurium* ATCC 14028. Calles 2 y 3: perfiles S1 y S2. (B) Perfiles obtenidos con el iniciador C. Calles λ: ADN del fago λ digerido con *PstI* Calle 1: *S. Typhimurium* ATCC 14028. Calles 2 y 3: perfiles C1 y C2

El iniciador C también diferenció dos perfiles dentro de la serie (Fig. 24B). El 97,6% de los aislamientos (82) presentó el perfil C1, caracterizado por cuatro bandas de tamaños comprendidos entre 2.150 y 600 pb. El perfil C2, también cuatro bandas (entre 900 y 300 pb), sólo se encontró en

dos aislamientos. La cepa de referencia Typhimurium ATCC 14028, presentó un perfil S similar a los de *S. Hadar*, mientras que el perfil C fue claramente diferente.

I.2.b. Macrorrestricción-PFGE

Para el análisis de los aislamientos de *S. Hadar* se valoraron dos endonucleasas de restricción: *XbaI* y *BlnI*. Con *XbaI* se generaron tres perfiles principales denominados X1 a X3 y formados por 14-15 fragmentos con tamaños comprendidos entre 20 y 1.135 Kb (Fig. 25). Dentro de estos perfiles se definieron subtipos, nombrados con letras minúsculas, en base a fragmentos de ADN que fueron posteriormente identificados como plásmidos (apartado 1.4.b). La mayoría de los aislamientos (79,8%) mostraron el perfil X1, con tres subperfiles X1a, X1b y X1c, de acuerdo con la ausencia de ADN extracromosómico (X1a) o la presencia de plásmidos de 23 o 45 Kb (X1b y X1c, respectivamente). El perfil X2 estuvo representado por 16 aislamientos, sin plásmidos detectables (X2a) o con el plásmido de 23 Kb (X2b). El perfil X3 incluyó un único aislamiento.

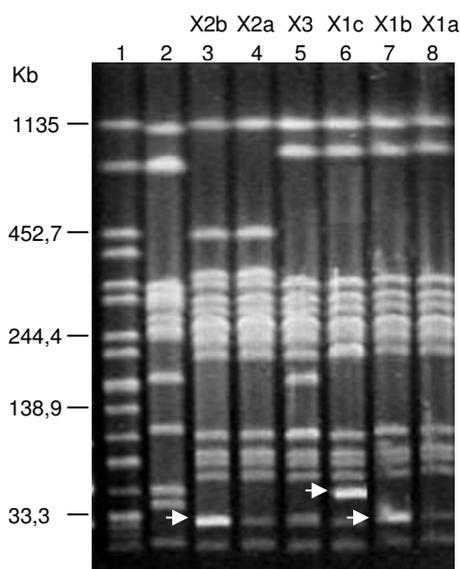


Figura 25. Perfiles generados mediante *XbaI*-PFGE a partir de los aislamientos de *S. Hadar*. Calles: 1) cepa de referencia H9812 (*S. Braenderup*). 2) *S. Enteritidis* ATCC 13076. 3 y 4) perfil X2. 5) perfil X3. 6-8) perfil X1. Se señalan con flechas los fragmentos de 45 y 23 Kb identificados como plásmidos y que sirvieron para establecer subtipos

Debido a la escasa discriminación obtenida, se valoró la endonucleasa *BlnI* en aislamientos representativos de los tres perfiles *XbaI*: el único X3, 11 X2 y 26 del mayoritario X1. Se obtuvieron siete perfiles distintos (B1-B7), consistentes en 8-12 fragmentos de tamaños comprendidos entre 10

y 1.135 Kb (Fig. 26A). Una vez más se pudieron establecer subtipos (designados con letras minúsculas) en base a la presencia de fragmentos identificados como plásmidos. Todos los aislamientos X2 analizados mostraron el mismo patrón de bandas *BlnI* (perfil B2), mientras que los aislamientos X1 mostraron seis perfiles diferentes (B1, B3-B7). Los patrones B1 y B3 englobaron el mayor número de aislamientos (15 y 7, respectivamente) y B3 incluyó además al único aislamiento X3. El resto de los perfiles *BlnI* fue presentado por un sólo aislamiento X1. Como cepa fuera de grupo, se utilizó *S. Braenderup* H9812, cuyos perfiles *XbaI* y *BlnI* fueron claramente diferentes.

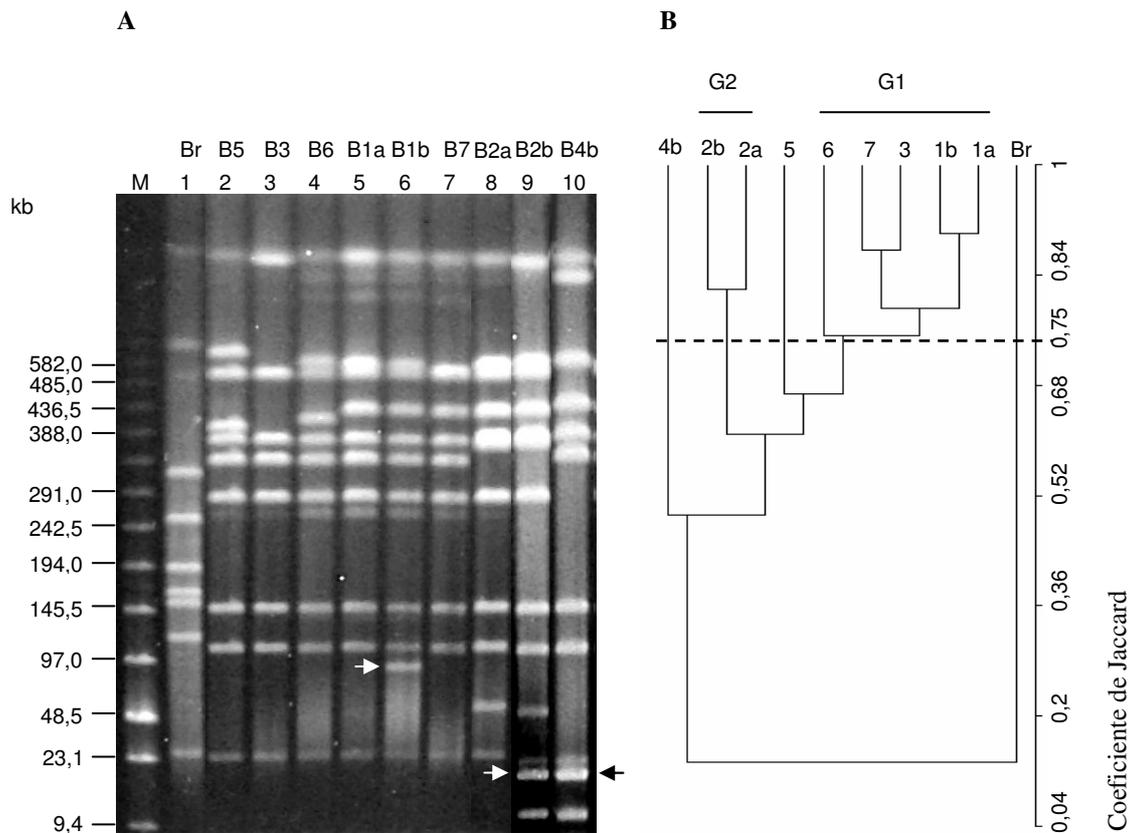


Figura 26. (A) Perfiles *BlnI*-PFGE. Calle M: Marcador de peso molecular λ ladder. Calle 1: *S. Braenderup* H9812. Calles 2-10: *S. Hadar* perfiles B5, B3, B6, B1a, B1b, B7, B2a, B2b, B4b. Se señalan con flechas los fragmentos identificados como plásmidos (B) Dendrograma de similitud basado en los perfiles *BlnI*-PFGE

Dado el superior poder de discriminación de *BlnI*, los perfiles obtenidos se utilizaron para generar un dendrograma (Fig. 26B). Estableciendo el punto de corte a $S = 0,75$ se definieron dos agrupaciones (G1 y G2) y dos ramas independientes. Los perfiles B1 (a y b), B3, B6 y B7 formaron el grupo mayoritario (G1), que engloba al 65,8% de los aislamientos analizados, mientras que todos

los aislamientos B2 (a y b) se incluyeron en el grupo G2 (28,9%). Las dos ramas independientes están formadas por los únicos aislamientos B4 y B5 (2,63% cada una de ellas). *S. Braenderup* (cepa fuera de grupo) tiene un coeficiente de similitud $S = 0,13$ respecto a *S. Hadar*.

Unificando los resultados conseguidos mediante los dos métodos de tipificación, se puede concluir que la mayoría de los aislamientos analizados (79,8%) presentaron el perfil RAPD combinado S1C1, donde se encuadran casi todos los aislamientos X1 (62), el único perfil X3 y 4 aislamientos X2, así como representantes de todos los perfiles *BlnI*. Por otro lado, el perfil S2C1 (17,9%) está formado esencialmente por aislamientos X2 (12), incluyendo tres aislamientos X1 y representantes B2 y B1. Por último, sólo dos aislamientos (2,4%), ambos X1B1, presentaron el perfil S1C2 (Tabla 6).

Tabla 6. Correlación de perfiles RAPD y PFGE

RAPD	PFGE	Aislamiento LSP representativos
S1C1	X1B1	64/95; 65/95; 248/96; 310/96; 543/96; ; 153/97; 113/98; 543/98; 25/99; 24/01; 39/01; 481/01
	X1B3	225/95; 318/95; 374/95; 40/96; 444/96; 12/97; 186/98
	X1B4	542/96
	X1B5	9/97
	X1B6	112/00
	X1B7	529/01
	X2B2	282/97; 247/98; 281/98
	X3B3	509/98
S1C2	X1B1	389/95; 343/97
S2C1	X1B1	124/01
	X2B2	501/95; 505/95; 562/95; 578/95; 175/96; 444/98; 44/99; 58/99

I.3. RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS

En función de las resistencias detectadas se identificaron 13 perfiles (Tabla 8), designados R0 (que incluye a los aislamientos susceptibles) a R12. Las resistencias individuales más comunes fueron tetraciclina (79,8%), estreptomicina (76,2%) y ácido nalidíxico (76,2%), seguidas de ampicilina-cefalotina (50%). Todos los aislamientos resistentes a ácido nalidíxico presentaron una disminución de la susceptibilidad a ciprofloxacino (CMI de 0,5 µg/ml). No se encontraron resistencias a cloranfenicol, kanamicina, sulfadiacina ni trimetoprim-sulfametoxazol.

Los perfiles mayoritarios fueron R11 y R8, con 34 y 24 aislamientos que, en conjunto, comprenden el 69% de la serie. Es destacable, además, la aparición de resistencia a gentamicina en un único aislamiento de 2001 (perfil R12), que comparte las demás resistencias (ácido nalidíxico,

ampicilina-cefalotina, estreptomina y tetraciclina) con el perfil R11. Estos dos perfiles mayoritarios incluyen a los aislamientos multiresistentes (MDR; resistentes a cuatro o más agentes no relacionados). El tercer perfil en frecuencia fue el R0, con 12 aislamientos susceptibles a todos los antimicrobianos ensayados (14,3%). El resto de aislamientos se distribuyó en los diez perfiles restantes, cada uno de los cuales tiene un máximo de dos representantes.

I. 4. GENES Y ELEMENTOS GENÉTICOS IMPLICADOS EN LA RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS

I.4.a. Identificación de determinantes de resistencia a antimicrobianos

El uso de oligonucleótidos específicos para los genes *aac(3)II*, *aac(3)IV*, *aadA1a*, *strA*, *strB*, *dfrA1*, *dfrA12*, *bla_{OXA-1}*, *bla_{PSE-1}*, *bla_{TEM-1}*, *tet(A)*, *tet(B)* y *tet(G)* nos permitió identificar los determinantes genéticos más relevantes para las resistencias observadas. En resumen:

- Todos los aislamientos resistentes a estreptomina y tetraciclina presentaron un amplicón del tamaño adecuado con los iniciadores para *strA/B* y *tet(A)*, respectivamente. Por el contrario, las amplificaciones de los genes *aadA1a*, *tet(B)* y *tet(G)* dieron un resultado negativo.
- Todos los aislamientos resistentes a ampicilina-cefalotina resultaron positivos para el gen *bla_{TEM}* y negativos para *bla_{PSE-1}* y *bla_{OXA-1}*. En extractos crudos de 4 de estos aislamientos se detectó una única especie de β -lactamasa, con un punto isoeléctrico de 5,4. Esto es compatible con la presencia de una proteína TEM-1, que confiere resistencia tanto a ampicilina como cefalotina.
- Los únicos aislamientos trimetoprim (LSP186/98) y gentamicina (LSP481/01) resistentes fueron positivos para *dfrA1* y *aac(3)IV*, respectivamente.
- En todos los aislamientos resistentes a ácido nalidíxico la amplificación de *gyrA*, gen que codifica para la subunidad A del enzima ADN-girasa, y su posterior digestión con *HinfI* sugirieron la existencia de una mutación en el codón Asp-87. La secuenciación de los amplicones *gyrA* de 5 cepas resistentes a ácido nalidíxico y con susceptibilidad disminuida a ciprofloxacino reveló la existencia de una mutación (GAC a AAC), que cambia el Asp-87 por Asn. No se encontraron mutaciones en los genes *gyrB* y *parC* de estos mismos aislamientos.

I.4.b. Análisis de integrones y plásmidos

En todos los aislamientos, las amplificaciones encaminadas a detectar integrones de clase 1 y 2 dieron resultados negativos. Por el contrario, la visualización de ADN extracromosómico mediante los métodos de lisis alcalina y S1-PFGE reveló la presencia de plásmidos en la mayoría de los aislamientos. Su tamaño varió entre 2 y 100 Kb, siendo destacable que los más pequeños sólo pudieron visualizarse mediante el método de lisis alcalina y los más grandes mediante S1-PFGE.

La hibridación de los perfiles S1-PFGE con sondas para los genes de resistencia previamente identificados revelaron la existencia de cinco plásmidos-R, designados pUO-*Sh*R1 a pUO-*Sh*R5 (Fig. 27; Tabla 7). En pUO-*Sh*R1, pUO-*Sh*R2 y pUO-*Sh*R4 solamente se localizó el gen de resistencia *bla*_{TEM-1}, mientras que pUO-*Sh*R3 y pUO-*Sh*R5 presentaron además los genes *dfrA1* y *aac(3)IV-strA/B*, respectivamente.

- pUO-*Sh*R1, tiene un tamaño de 9 Kb y una incidencia global del 36,9%. Fue el plásmido-R de menor tamaño encontrado en la serie. Apareció por primera vez en un aislamiento MDR (LSP542/96) de 1996. Desde entonces su frecuencia fue en aumento, llegando a estar presente en el 69,2% de los aislamientos recogidos en 2001. Los datos de los años posteriores resultan poco significativos estadísticamente, debido al bajo número de aislamientos registrados.

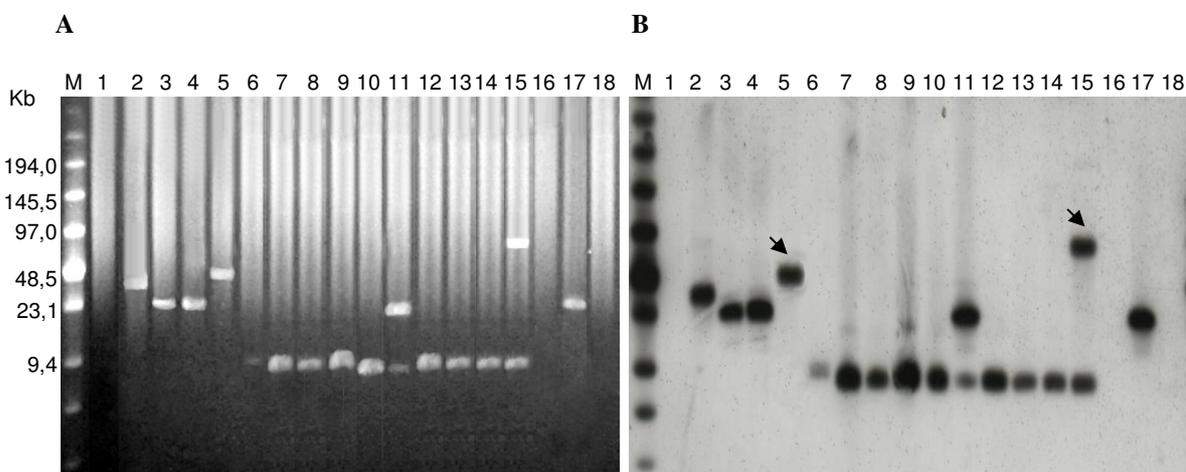


Figura 27. Análisis de plásmidos de aislamientos representativos de *S. Hadar*. (A) Plásmidos visualizados mediante S1-PFGE. Calles 1-18: LSP 509/98; 186/98; 501/95; 562/95; 40/96; 282/97; 543/98; 153/97; 112/00; 24/01; 542/96; 25/99; 529/01; 9/97; 481/01; 225/95; 39/01; 113/98. Calle M: marcador de peso molecular λ ladder. (B) Hibridación del panel A con *bla*_{TEM-1}. Los plásmidos de 30 y 95 Kb, resultaron positivos también para hibridaciones con: *dfrA1* y *strA/B-acc(3)IV*, respectivamente, se indican con flechas

- pUO-*ShR2*, es un plásmido de unas 23 Kb. Se detectó por primera vez en 1995, manteniéndose posteriormente, aunque con una frecuencia baja (7,5%).
- pUO-*ShR3*, de unas 30 Kb, apareció en el único aislamiento resistente a trimetoprim (LSP186/98), resistencia codificada en este plásmido.
- pUO-*ShR4*, plásmido de 45 Kb, se encontró solamente en dos aislamientos (LSP374/95 y LSP40/96) de 1995 y 1996, respectivamente.
- pUO-*ShR5*, es el de mayor tamaño, unas 95 Kb. Apareció en una única cepa (LSP481/01) junto con pUO-*ShR1*. Esta cepa es también la única que presenta resistencia a gentamicina, codificada por el gen *aac(3)IV* localizado en el plásmido.

Para una mejor caracterización de los plásmidos-R identificados, se llevaron a cabo experimentos de conjugación y transformación. Todos los plásmidos, excepto pUO-*ShR1*, fueron conjugativos, presentando los transconjugantes analizados el fenotipo-R de las cepas donadoras. Además, la adquisición de los genes de resistencia esperados se confirmó mediante amplificación. Por otro lado, pUO-*ShR1* pudo ser introducido en *E. coli* tanto por transformación artificial, como de manera natural, movilizado por pUO-*ShR5* en conjugaciones entre LSP481/01, aislamiento portador de ambos plásmidos, y *E. coli*.

Tabla 7. Características de los plásmidos de resistencia detectados en *S. Hadar*

Plásmido	Kb	Transferencia a <i>E. coli</i>		Genes-R adquiridos/ Fenotipo conferido	% (n)	Perfil-R
		T	C			
pUO- <i>ShR1</i>	9	+	-	<i>bla</i> _{TEM} /[AMP-CEF]	36,9 (31)	R9, R10, R11
pUO- <i>ShR2</i>	23	na	+	<i>bla</i> _{TEM} /[AMP-CEF]	7,5 (6)	R11
pUO- <i>ShR3</i>	30	na	+	<i>bla</i> _{TEM} - <i>dfrAI</i> /[AMP-CEF]-TMP	1,2 (1)	R7
pUO- <i>ShR4</i>	45	na	+	<i>bla</i> _{TEM} /[AMP-CEF]	2,4 (2)	R3, R6
pUO- <i>ShR5</i>	95	na	+	<i>bla</i> _{TEM} - <i>aac(3)IV-strA/B</i> /[AMP-CEF]-GEN-STR	1,2 (1)	R12

n, número de aislamientos que presentan ese plásmido frente al número total (84) de aislamientos analizados

T, transformación; C, conjugación; -, negativo; na, no analizado.

Finalmente, para determinar si existía una superproducción de la β -lactamasa tipo TEM-1 codificada por los plásmidos-R que explicase la resistencia conjunta a los dos β -lactámicos ensayados, se seleccionaron aislamientos representativos y se analizó su resistencia a amoxicilina-clavulánico (AMC). Todos los aislamientos portadores de pUO-*ShR1* fueron resistentes a AMC (con halos de inhibición entre 10 y 13 mm de diámetro) y los que contenían alguno de los otros plásmidos-R presentaron una sensibilidad intermedia (con halos de entre 14 y 16 mm). También se encontraron diferencias en las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) para cefalotina. Los

aislamientos positivos para pUO-*ShR1* presentaban CMIs ≥ 128 $\mu\text{g/ml}$ frente a los valores de 32 $\mu\text{g/ml}$ del resto. Estos resultados sugieren una superproducción de la β -lactamasa que podría estar relacionada con el número de copias de los plásmidos. Este se espera que sea superior en el caso de pUO-*ShR1*, debido a su menor tamaño.

I.4.c. Localización de determinantes de resistencia en los perfiles de macrorrestricción-PFGE

Los perfiles *XbaI* y *BlnI* de los 38 aislamientos sometidos a restricción con ambas endonucleasas se hibridaron con sondas específicas para distintos genes-R. Los resultados se muestran en las figura 28 y se recopilan en la tabla 8.

- En los aislamientos resistentes a estreptomicina, la sonda *strA/B* hibridó en tres fragmentos diferentes, de aproximadamente 580 Kb en los perfiles B1, B2 y B6, 435 Kb en el perfil B4 y 570 Kb en el perfil B7. En LSP481/01 se encontró una segunda copia de los genes *strA/B*, localizada en un fragmento de unas 95 Kb, identificado como pUO-*ShR5* y utilizado para definir el perfil B1b de dicho aislamiento.
- En los aislamientos resistentes a tetraciclina, la sonda *tet(A)* hibridó en una banda de 435 Kb en los perfiles B1, B2 y B7 y en bandas de 580 Kb, 390 Kb y 410 Kb en los perfiles B4, B5 y B6, respectivamente.
- En todos los aislamientos resistentes a estreptomicina y tetraciclina, las sondas *strA/B* y *tet(A)* hibridaron en un fragmento *XbaI* de unas 240 Kb, aparentemente común a todos los perfiles X, aunque cada una lo había hecho en un fragmento *BlnI* diferente. Esto podría explicarse por la existencia de un sitio de restricción *BlnI* dentro del fragmento *XbaI* o bien por la superposición de más de un fragmento *XbaI* en la zona del gel correspondiente a 240 Kb.
- Además, en un aislamiento resistente a tetraciclina (LSP374/95), la sonda *tet(A)* hibridó en una banda *XbaI* de 45 Kb (en la misma posición que el plásmido pUO-*ShR4*), mientras que en el correspondiente perfil *BlnI* no se observó hibridación. Este gen podría localizarse en un fragmento *BlnI* demasiado pequeño para su visualización mediante PFGE. Esto mismo podría suceder con un segundo aislamiento (LSP318/95) en el cual la sonda *tet(A)* hibridó en el fragmento *XbaI* de 240 Kb, pero no en el perfil *BlnI*.
- Todos los aislamientos resistentes a ampicilina-cefalotina portaban el gen *bla*_{TEM-1} solo o combinado con otros determinantes de resistencia, dependiendo del plásmido-R. Sin embargo sólo alguno de estos plásmidos pudo detectarse en los perfiles *XbaI* (pUO-*ShR2* y

pUO-*ShR4*) o *BlnI* (pUO-*ShR2* y pUO-*ShR5*). De acuerdo con lo esperado, los fragmentos de 23, 45 y 95 Kb (pUO-*ShR2*, pUO-*ShR4* y pUO-*ShR5*, respectivamente) dieron señal positiva con la sonda *bla*_{TEM-1}. Además, el fragmento de 95 Kb hibridó también con *strA/B* y *aac(3)IV*.

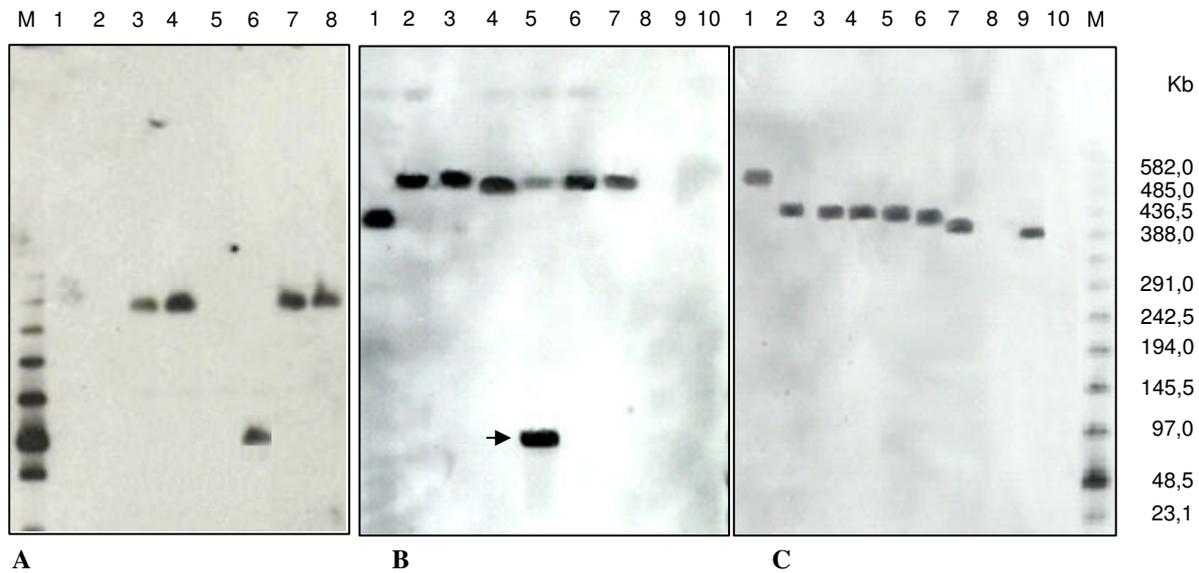


Figura 28. Localización de determinantes de resistencia en el genoma de *S. Hadar*. **(A)** Hibridación de los perfiles *XbaI*-PFGE (Fig. 25) con la sonda *tet(A)*. Calle M: λ ladder. Calle 1: *S. Braenderoup* H9812. Calle 2: *S. Enteritidis* ATCC 13076. Calles 3-8: perfiles X2b, X2a, X3, X1c, X1b, X1a. En los aislamientos resistentes a estreptomicina, la sonda *strA/B* hibridó con los mismos fragmentos que la sonda *tet(A)*. **(B)** y **(C)** Hibridación de los perfiles *BlnI*-PFGE (Fig. 26) con las sondas *strA/B* y *tet(A)*, respectivamente. Calle M: λ ladder. Calle 10: H9812. Calles 1-9: B4b, B2b, B2a, B7, B1b, B1a, B6, B3 y B5. El fragmento de 95 Kb (de origen plasmídico), señalado con una flecha, también hibridó con una sonda *aac(3)IV*

Tabla 8. Perfiles de resistencia a antimicrobianos encontrados en aislamientos de *S. Hadar*. Distribución en perfiles de macrorrestricción-PFGE, contenido de plásmidos-R y localización de determinantes-R en el genoma bacteriano

Perfil R (N=84)	Fenotipo-R/Genotipo-R	PFGE-tipos		Plásmido(s)-R ^a	Localización de genes-R en perfiles <i>XbaI</i> -, <i>BlnI</i> - y S1-PFGE (<i>XbaI/BlnI/S1</i> tamaños en Kb)					Aislamientos representativos
		<i>XbaI</i> (N=84)	<i>BlnI</i> (N=38)		<i>strA/B</i>	<i>tet(A)</i>	<i>bla</i> _{TEM}	<i>dfrA1</i>	<i>acc(3)-IV</i>	
R0 (12)	Susceptible	X1 (10)	B3 (3)	-	-	-	-	-	-	LSP225/95
		X2 (1)	B2 (1)	-	-	-	-	-	-	LSP247/98
		X3 (1)	B3 (1)	-	-	-	-	-	-	LSP509/98
R1 (1)	STR/ <i>strA/B</i>	X1 (1)	B1 (1)	-	240/580/-	-	-	-	-	LSP113/98
R2 (2)	TET/ <i>tet(A)</i>	X1 (2)	B1 (1)	-	-	240/435/-	-	-	-	LSP65/95
			B3 (1)	-	-	240/-/-	-	-	-	LSP318/95
R3 (1)	[AMP-CEF]/ <i>bla</i> _{TEM}	X1 (1)	B3 (1)	pUO- <i>ShR4</i>	-	-	45/-/45	-	-	LSP40/96
R4 (2)	STR-TET/ <i>strA/B-tet(A)</i>	X1 (2)	B1 (1)	-	240/580/-	240/435/-	-	-	-	LSP64/95
R5 (1)	TET-NAL/ <i>tet(A)-gyrA*</i>	X1 (1)	B1 (1)	-	-	240/435/-	-	-	-	LSP248/96
R6 (1)	[AMP-CEF]-TET/ <i>bla</i> _{TEM} - <i>tet(A)</i>	X1 (1)	B3 (1)	pUO- <i>ShR4</i>	-	45/-/-	45/-/45	-	-	LSP374/95 ^b
R7 (1)	[AMP-CEF]-TMP/ <i>bla</i> _{TEM} - <i>dfrA1</i>	X1 (1)	B3 (1)	pUO- <i>ShR3</i>	-	-	-/-/30	-/-/30	-	LSP186/98 ^b
R8 (24)	STR-TET-NAL/ <i>strA/B-tet(A)-gyrA*</i>	X1 (12)	B1 (5)	-	240/580/-	240/435/-	-	-	-	LSP310/96
		X2 (12)	B2 (7)	-	240/580/-	240/435/-	-	-	-	LSP175/96
R9 (2)	[AMP-CEF]-STR-NAL/ <i>bla</i> _{TEM} - <i>strA/B-gyrA*</i>	X1 (2)	B1 (1)	pUO- <i>ShR1</i>	240/580/-	-	-/-/9	-	-	LSP24/01
R10 (2)	[AMP-CEF]-TET-NAL/ <i>bla</i> _{TEM} - <i>tet(A)-gyrA*</i>	X1 (1)	B5 (1)	pUO- <i>ShR1</i>	-	240/390/-	-/-/9	-	-	LSP9/97 ^b
		X2 (1)	B2 (1)	pUO- <i>ShR1</i>	-	240/435/-	-/-/9	-	-	LSP282/97
R11 (34)	[AMP-CEF]-STR-TET-NAL/ <i>bla</i> _{TEM} - <i>strA/B-tet(A)-gyrA*</i>	X1 (32)	B1 (4)	pUO- <i>ShR1</i>	240/580/-	240/435/-	-/-/9	-	-	LSP153/97 ^b ; LSP543/98; LSP25/99
			B4 (1)	pUO- <i>ShR2</i>	240/580/-	240/435/-	23/23/23	-	-	LSP39/01
		B6 (1)	pUO- <i>ShR1</i>	240/435/-	240/580/-	-/-/9	-	-	LSP542/96 ^b	
		B7 (1)	pUO- <i>ShR1</i>	240/580/-	240/410/-	-/-/9	-	-	LSP112/00 ^b	
R12 (1)	[AMP-CEF]-GEN-STR-TET-NAL/ <i>bla</i> _{TEM} - <i>aac(3)IV-strA/B-tet(A)-gyrA*</i>	X2 (2)	B2 (2)	pUO- <i>ShR2</i>	240/580/-	240/435/-	23/23/23	-	-	LSP562/95; LSP501/95 ^b
		X1 (1)	B1 (1)	pUO- <i>ShR1/R5</i>	240/580/95	240/435/-	-/-/9	-	-/95/95	LSP481/01 ^b
								-/95/95		

^apUO-*ShR*: plásmido de la Universidad de Oviedo-*Salmonella* Hadar Resistencia.

N, número de aislamientos analizados; (n), número de aislamientos que presentan la característica correspondiente; -, negativo; *gyrA**, mutación del codón Asp87 a Asn. ^b, En estos aislamientos se determino la CMI a cefalotina y el diámetro de inhibición de AMC; Los fragmentos de 9, 23, 30, 45 y 95 Kb se corresponden a los plásmidos pUO-*ShR1*-pUO-*ShR5*, respectivamente (Fig. 25-27).

La mayor parte de estos resultados se han recogido en la publicación:

- **Martínez, N.**, M. C. Mendoza, B. Guerra, M. A. González-Hevia y M. R. Rodicio. 2005. Genetic basis of antimicrobial drug resistance in clinical isolates of *Salmonella enterica* serotype Hadar from a Spanish region. *Microb. Drug Resist.* **11**: 185-193.

Y en las comunicaciones a congresos:

- **Martínez, N.**, B. Guerra, S. Soto, M. González-Hevia, M. R. Rodicio y M. C. Mendoza. 2003. Fenotipos, genes y plásmidos de resistencia a antimicrobianos en *Salmonella enterica* serotipo Hadar aisladas en el Principado de Asturias. VII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Quimioterapia (SEQ). Zaragoza.
- **Martínez, N.**, B. Guerra, M. González-Hevia, M. R. Rodicio y M. C. Mendoza. 2003. Tipos genéticos y resistencia a antimicrobianos en *Salmonella* serotipo Hadar: un serotipo emergente en diferentes países europeos. XIX Congreso Nacional de Microbiología (SEM). Santiago de Compostela.
- **Martínez, N.**, M. C. Mendoza, M. C. Martín, I. Rodríguez, A. Herrero y M. R. Rodicio. 2004. Técnicas moleculares como herramientas para el estudio de la resistencia a agentes antimicrobianos en *Salmonella enterica* serotipo Hadar. Congreso Nacional de Biotecnología (BIOTEC'04). Oviedo.

II. Epidemiología Molecular de *Salmonella enterica* serotipo Brandenburg en el Principado de Asturias

II.1. DATOS EPIDEMIOLÓGICOS

En cuanto a los aspectos epidemiológicos de la salmonelosis por *S. Brandenburg* en el Principado de Asturias (Anexo I, Tabla I.b), el estudio de la evolución temporal y espacial reveló una baja incidencia de este serotipo, con sólo 37 aislamientos registrados durante el periodo 1993-2005 (Tabla 9). En la mayor parte de los años el número varió de cero a tres, por lo que destacan 1995, 1997 y 2000, con nueve, seis y diez aislamientos, respectivamente. De nuevo, el mayor número de aislamientos corresponde al área V (19), seguida del área IV (10). 32 aislamientos, recuperados de heces, causaron episodios de diarrea aguda (30) o recurrente (2), uno (procedente de orina) se vio implicado en una infección urinaria y otro (obtenido de un absceso) en una infección focal. Todos estos aislamientos se registraron como responsables de casos aislados, aunque nueve de ellos, recuperados en el área V durante los meses de septiembre y octubre, originaron un brote comunitario no declarado oficialmente (ver Discusión). Los tres aislamientos restantes no proceden de muestras clínicas sino de alimentos (dos, obtenidos de derivados cárnicos) y de un agua residual (1).

Tabla 9. Dispersión espacial y temporal de los aislamientos de *S. Brandenburg* en el Principado de Asturias (1993-2005)

Año(s)	Total	Áreas Sanitarias afectadas (nº aislamientos)								Presentación de los casos	
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	Clínica:casos	Epidemiología:casos
1993	2			2						DR:1	CA
1995	9		1	1	4	3				DA:8	CA
										AR	
1996	1					1				DA:1	CA
1997	6		1	2		3				DA:4	CA
										AB:1	
1998	1					1				DA	CA
1999	1					1				DA	CA
2000	10				1	9				DA:9	Bnd: 9
										C:1	CA:1
2001	2				2					DA:1	CA
										C:1	
2002	3				3					DA:3	CA
2004	1					1				DA:1	CA
2005	1								1	O:1	CA
1993-2005	37	0	2	5	10	19	0	0	1		

AR: Agua Residual; C: Carne; AB: Absceso; O: Orina; DA: Diarrea Aguda
CA: Caso Aislado; Bnd: posible brote no declarado oficialmente (9 afectados)

En cuanto a la estacionalidad de la salmonelosis por *S. Brandenburg*, se registraron 13 episodios clínicos en el periodo frío (noviembre a abril) y 19 (59,4%) en el cálido (mayo a

octubre). Por otro lado, la incidencia fue ligeramente superior en mujeres (20; 62,5%) que en hombres (12; 38,5%). En siete episodios no constaba la edad del paciente. En cuanto al resto, el 32% de los casos ocurrió en niños menores de dos años, mientras en los demás grupos de edad la frecuencia fue cercana al 20%.

II.2. TIPIFICACIÓN MEDIANTE MÉTODOS GENOTÍPICOS

II.2.a. RAPD

Se amplificaron secuencias no conocidas del genoma de *S. Brandenburg* usando los iniciadores aleatorios S y C. El primero diferenció dos perfiles entre los aislamientos de la serie (Fig. 29A). Se encontró un perfil prevalente (S1), presentado por 30 aislamientos y definido por cuatro bandas entre 1.100 y 650 pb. Los otros siete aislamientos presentaron el perfil S2, con cinco bandas entre 1.000 y 450 pb.

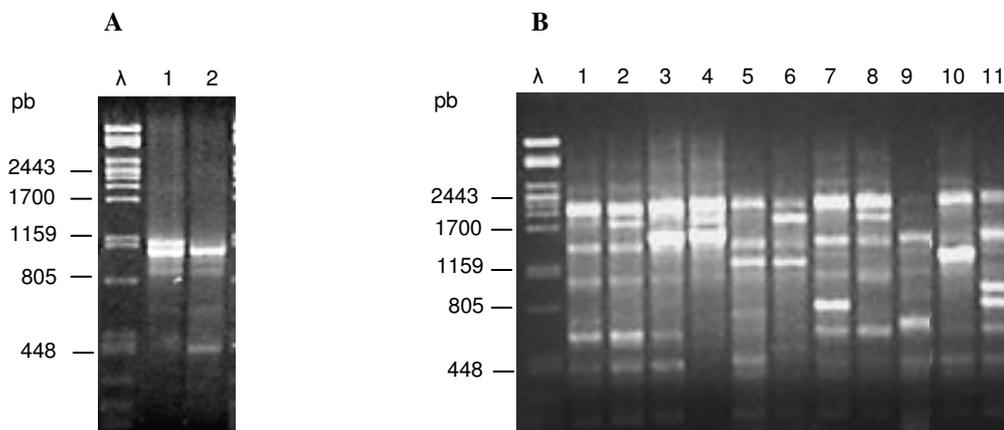


Figura 29. Perfiles obtenidos mediante tipificación RAPD en *S. Brandenburg*. **(A)** Iniciador S. Calle λ: ADN del fago λ digerido con *Pst*I. Calle 1: perfil S1. Calle 2: S2. **(B)** Iniciador C. Calle λ: ADN del fago λ digerido con *Pst*I. Calle 1-11: perfiles C1-C11, respectivamente

A diferencia del anterior, el iniciador C reveló grandes variaciones en el genoma de *S. Brandenburg*, encontrándose 11 perfiles: C1-C11 (Fig. 29B) con fragmentos comprendidos entre 2.300 y 450 pb. El perfil mayoritario fue C3 (13 aislamientos), seguido de C1 (7), mientras que el resto apareció en un máximo de cuatro aislamientos.

II.2.b. Macrorrestricción-PFGE.

El análisis de macrorrestricción con la endonucleasa *XbaI* seguida de PFGE confirmó la elevada diversidad de los aislamientos *S. Brandenburg* circulantes en el Principado de Asturias durante 1993-2005. En total se detectaron 12 perfiles (X1-X12), constituidos por 12 a 19 fragmentos, con tamaños comprendidos entre 20 y 1.135 Kb (Fig. 30A). Aunque ninguno de ellos incluyó un elevado número de aislamientos, el mayoritario fue X9 (nueve aislamientos), seguido por X1 (5) y por X2 y X3 (cada uno con cuatro aislamientos). El resto fue presentado por uno, dos o tres aislamientos.

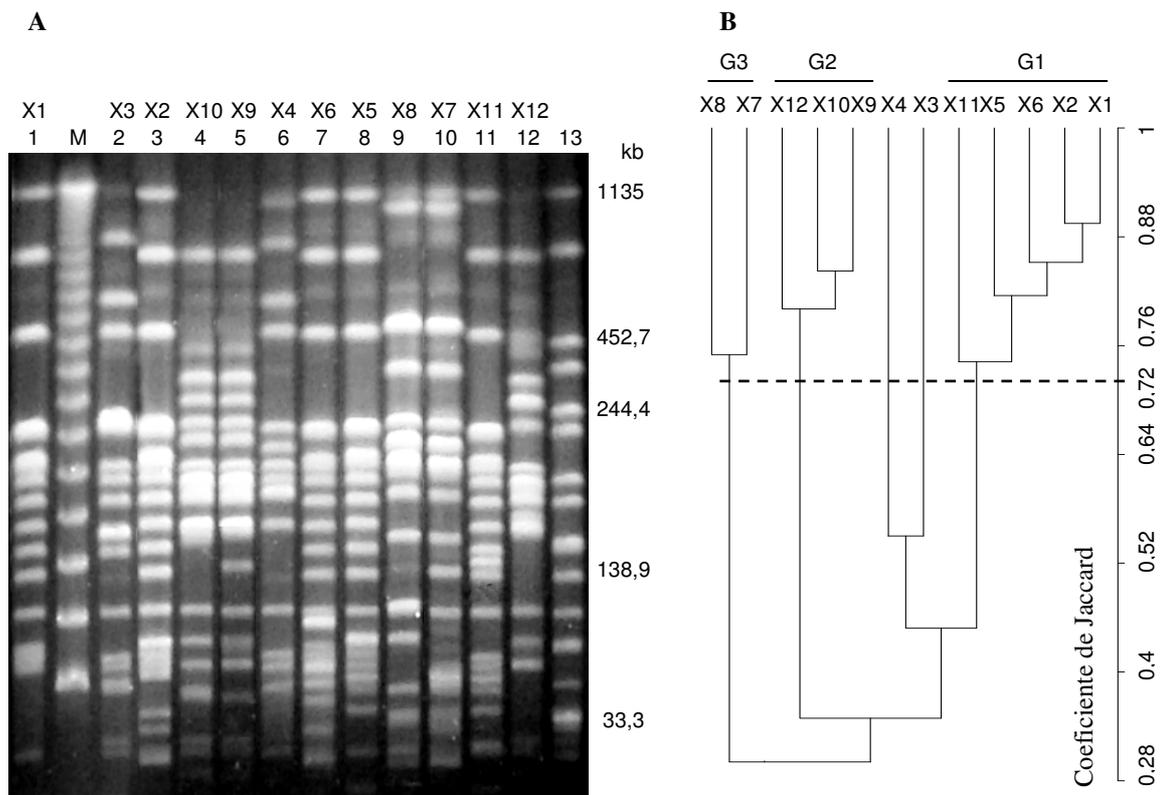


Figura 30. (A) Perfiles *XbaI*-PFGE generados a partir de los aislamientos de *S. Brandenburg*. Calle 1: perfil X1. Calles 2 a 12: X3, X2, X10, X9, X4, X6, X5, X8, X7, X11, X12, respectivamente. Calle M: marcador de peso molecular λ ladder. Calle 14: *S. Braenderup* H9812. (B) Dendrograma de similitud construido a partir de los perfiles *XbaI*-PFGE

El dendrograma de similitud construido en base a los perfiles *XbaI* a un punto de corte de $S = 0,72$ identificó tres grupos, G1 a G3 y dos ramas independientes, correspondientes a los perfiles X3 y X4 (Fig. 30B). G1 incluyó cinco perfiles (X1, X2, X5, X6 y X11; 35,1% de los aislamientos;

$S \geq 0,74$), mientras que G2 agrupó a tres (X9, X10 y X12; 35,1% de la serie; $S \geq 0,80$) y G3 a 2 (X7 y X8; 10,8% de la serie; $S \geq 0,75$). La gran diversidad genómica de los aislamientos de la serie queda reflejada por el bajo valor de S entre el total de los perfiles ($S = 0,30$, correspondiente al último nudo del dendograma). El coeficiente de similitud de *S. Braenderup* (cepa fuera de grupo) con respecto a *S. Brandenburg* fue $S = 0,15$.

La heterogeneidad de los aislamientos de *S. Brandenburg* quedó aún más manifiesta en el análisis de macrorrestricción con la endonucleasa *BlnI*. Los 14 perfiles obtenidos (B1 a B14) presentaron de 8 a 16 fragmentos con tamaños comprendidos entre 20 y 1.135 Kb (Fig. 31A). B1 resultó ser el perfil mayoritario englobando siete aislamientos de los años 1993-1997. El perfil B2 es muy similar a B1 y apareció en un único aislamiento de 1995. El perfil B7 es el segundo en frecuencia, encontrándose en cinco aislamientos del año 2000. Muy similares a B7 fueron B8 (tres aislamientos de 2002-2004), B9 (1 aislamiento de 1998) y B10 (4 aislamientos de 2000). Al igual que B10, B3 incluyó cuatro aislamientos (de 1995-2001), mientras que los demás perfiles fueron presentados por uno, dos o tres aislamientos.

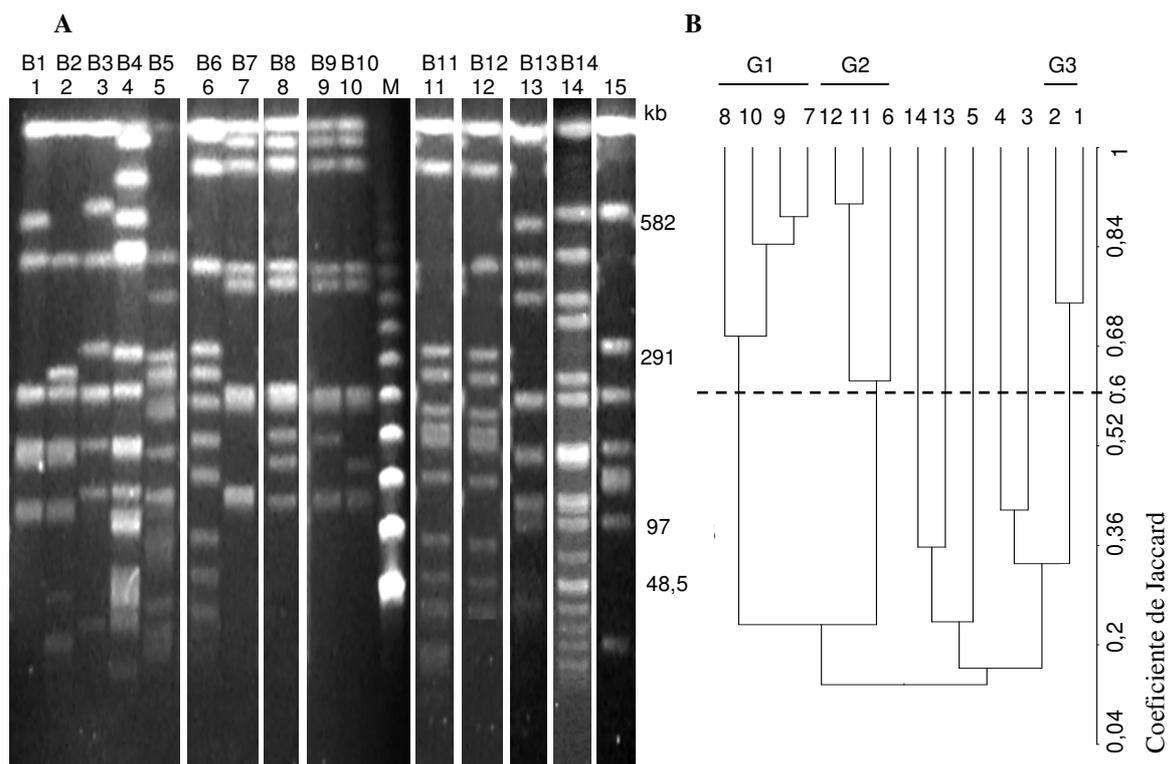


Figura 31. (A) Perfiles *BlnI*-PFGE de los aislamientos de *S. Brandenburg*. Calles 1-14: perfiles de B1-B14. Calle M: marcador de peso molecular λ ladder. Calle 15: *S. Braenderup* H9812. (B) Dendograma de similitud basado en los perfiles *BlnI*-PFGE

A un valor $S = 0,60$, *BlnI* sólo estableció tres agrupaciones (G1 a G3) quedando cinco ramas independientes (Fig. 31B). Con una similaridad de $S \geq 0,69$, G1 incluyó cuatro perfiles (B7, B8, B9 y B10; 35,1% de la serie), G2, 3 perfiles (B6, B11 y B12; 10,8% de la serie; $S \geq 0,62$) y G3 2 perfiles (B1 y B2; 21,6% de la serie; $S \geq 0,75$). El coeficiente de similitud de *S. Braenderup* (cepa fuera de grupo) con respecto a *S. Brandenburg* fue 0,21.

Finalmente, al considerar los resultados obtenidos con los dos métodos de tipificación empleados, en la mayor parte de los casos no se observó una correlación clara entre perfiles RAPD y/o perfiles macrorrestricción-PFGE. En la tabla 10 se desglosa la gran diversidad de combinaciones obtenidas.

Tabla 10. Correlación de perfiles RAPD y PFGE

RAPD	PFGE	Cepas LSP	RAPD	PFGE	Cepas LSP
C1S1	X1B1	493/93; 497/93; 202/95	C3S2	X10B8	37/02
	X1B2	24/95	C4S1	X10B8	8/04
	X2B4	125/02	C5S2	X8B6	26/00
	X2B14	145/01	C6S1	X2B4	662/01
C1S2	X7B12	227/97	C6S2	X7B11	338/97
C2S1	X7B11	407/97	C7S1	X3B3	8/95; 9/95; 190/95; 34/05
	X11B13	52/99	C8S1	X1B1	136/97
C3S1	X9B7	385/00; 484/00; 487/00; 490/00; 571/00		X5B1	331/96
	X9B10	396/00; 422/00; 423/00; 483/00	C8S2	X5B1	20/97
	X2B4	203/95	C9S2	X6B1	19/97
	X12B8	272/02	C10S2	X4B5	579/95
	X12B9	545/98	C11S1	X4B5	379/95; 527/95

II.3. RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS

El análisis de la susceptibilidad a antimicrobianos identificó 13 perfiles de resistencia (R0-R12) entre los aislamientos de *S. Brandenburg* (Tabla 12). La mayoría (43,2%; distribuidos entre 1995-2004), resultó sensible a todos los agentes ensayados: perfil R0. El segundo perfil en frecuencia fue R12 (18,9% de la serie), detectado entre los años 1995 y 1997. Se trata de un perfil MDR, que incluye resistencia a siete antimicrobianos no relacionados (AMP-CHL-KAN-STR-SUL-TET-TMP). Los perfiles R9, R10 y R11, también MDR, se encontraron en cinco aislamientos entre los años 1997 y 2002 (13,5%). Los demás perfiles incluyeron uno o dos aislamientos y un máximo de tres resistencias.

Por otro lado, las resistencias individuales más comunes fueron estreptomicina (48,7%), tetraciclina (40,5%), kanamicina (37,8%), cloranfenicol y trimetoprim (35,1%), ampicilina y sulfadiacina (32,4%). Por último, cabe destacar la presencia de un único aislamiento (LSP527/95; perfil R4) resistente a ácido nalidíxico, que también mostró susceptibilidad reducida a ciprofloxacino (CMI = 2 µg/ml).

II.4. GENES Y ELEMENTOS GENÉTICOS IMPLICADOS EN LA RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS

II.4.a. Identificación de determinantes de resistencia a antimicrobianos

El uso de oligonucleótidos específicos para los genes *aac(3)II*, *aac(3)IV*, *aadA1a*, *aphAI*, *catA*, *cmlA*, *floR*, *strA*, *strB*, *sul1*, *sul2*, *sul3*, *dfrA1*, *dfrA12*, *bla_{OXA-1}*, *bla_{PSE-1}*, *bla_{TEM-1}*, *tet(A)*, *tet(B)* y *tet(G)* permitió identificar los determinantes genéticos responsables de las resistencias observadas.

- Todos los aislamientos resistentes a ampicilina dieron amplificación positiva para *bla_{TEM-1}* y negativa para *bla_{OXA-1}*, *bla_{PSE-1}*.
- Todos los aislamientos resistentes a cloranfenicol y kanamicina resultaron positivos para *catA* y *aphAI*, respectivamente, siendo los primeros negativos para *cmlA* y *floR*.
- Todos los aislamientos resistentes a estreptomicina presentaron un amplicón del tamaño esperado para *aadA1a*. La secuenciación de dos de los amplicones indicó que se trataba del gen *aadA1a*. Los genes *strA* y *strB* no se consiguieron amplificar.
- Todos los aislamientos resistentes a sulfadiacina dieron amplificación positiva para los genes *sul1* y *sul3* y negativa para *sul2*.
- Todos los aislamientos resistentes a trimetoprim resultaron positivos para *dfrA1* y negativos para *dfrA12*. La secuencia de dos amplicones confirmó su adscripción a *dfrA1*.
- Los dos únicos aislamientos resistentes a gentamicina (LSP52/99 y LSP145/01) fueron positivos para el gen *aac(3)IV* y negativos para *aac(3)II*.
- En el único aislamiento resistente a ácido nalidíxico (LSP527/95), que además presentaba susceptibilidad disminuida a ciprofloxacino, la amplificación de *gyrA* y posterior digestión con *HinfI* sugirieron la existencia de una mutación en el codón Asp-87. La secuenciación del amplicón reveló una mutación (GAC a GGC) que cambió el Asp-87 por glicina. No se encontraron mutaciones en los genes *gyrB* y *parC* de este aislamiento.

- En cuanto a la resistencia a tetraciclina, siete aislamientos (recogidos entre 1995 y 1997), presentaron el gen *tet(B)*, mientras que los ocho restantes (1997-2005), contenían el gen *tet(A)*.

II.4.b. Detección de integrones y transposones

Ninguna de las cepas de *S. Brandenburg* presentó integrones de clase 2 y 3 pero si se encontraron integrones de clase 1 (In-*Sb*). Concretamente, en los 12 (32,4%) aislamientos MDR (perfiles R9-R12), se obtuvo un amplicón de 1600 pb al utilizar iniciadores específicos para la región variable (RV) de los integrones de clase 1. Posteriormente amplificaciones anidadas, realizadas utilizando este fragmento como molde, demostraron la presencia de los genes *aadA1a* y *dfrA1*, responsables de la resistencia a estreptomicina y trimetoprim, respectivamente.

También se analizó la presencia de los transposones Tn3, Tn21, Tn9, Tn1721 y Tn10. (Anexos II y III) que, de acuerdo con la información existente, podrían contener alguno de los genes-R detectados en los aislamientos de *S. Brandenburg*. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

- A pesar de la posible asociación de *bla_{TEM-1}* con Tn3, no se consiguió amplificar el gen *tnpA*, que codifica la transposasa de dicho transposón, en aislamientos resistentes a ampicilina ni en ningún otro.
- Todos los aislamientos que contenían el integrón de clase 1 resultaron a su vez positivos para los genes *tnpA* y *tnpR*, que codifican la transposasa y resolvasa de Tn21. Los demás fueron negativos.
- Todos los aislamientos resistentes a cloranfenicol presentaron amplicones del tamaño adecuado con iniciadores específicos para *IS1*, secuencia de inserción que flanquea al transposón Tn9, y para el gen *catA1* contenido en dicho transposón.
- Todos los aislamientos resistentes a tetraciclina y portadores del gen *tet(B)* dieron amplicones del tamaño adecuado con los iniciadores del gen *tetR*, que codifica el represor de *tet(B)*, descritos por Morsczech *et al.* (2004) como específicos de Tn10. Los aislamientos positivos para *tet(A)* fueron negativos.
- Todos los aislamientos resistentes a tetraciclina y portadores del gen *tet(A)* resultaron positivos para dicho gen, cuando se utilizaron los oligonucleótidos tetA-F y tetAR-3, este último descrito por Hartman *et al.* (2003) como específico para Tn1721. Los aislamientos resistentes a tetraciclina portadores de *tet(B)* no presentaron amplificación.

II.4.c. Análisis de plásmidos-R

La visualización de ADN plasmídico mediante S1-PFGE reveló la existencia de plásmidos de gran tamaño en los aislamientos MDR (perfiles R9 a R12) de *S. Brandenburg* (Fig. 32). Cinco de ellos, denominados pUO-*SbR1*, pUO-*SbR2*, pUO-*SbR3*, pUO-*SbR4* y pUO-*SbR5*, fueron identificados como plásmidos-R mediante experimentos de conjugación (Tabla 11).

Tabla 11. Características de los plásmidos de resistencia detectados en *S. Brandenburg*

Plásmido	Kb	Transferencia a <i>E. coli</i>		Genes-R adquiridos/Fenotipo conferido	% (n)	Perfil-R
		T	C			
pUO- <i>SbR1</i>	300	na	+	<i>bla</i> _{TEM-1} - <i>catA1</i> - <i>aadA1a</i> - <i>sul1</i> - <i>sul3</i> - <i>dfrA1</i> - <i>tet(A)</i> / AMP-CHL-STR-SUL-TMP-SXT-TET	2,7 (1)	R9
pUO- <i>SbR2</i>	300	na	+	<i>bla</i> _{TEM-1} - <i>catA1</i> - <i>aphA1</i> - <i>aadA1a</i> - <i>sul1</i> - <i>sul3</i> - <i>dfrA1</i> - <i>tet(A)</i> / AMP-CHL-KAN-STR-SUL-TMP-SXT-TET	5,4 (2)	R10
pUO- <i>SbR3</i>	280	na	+	<i>bla</i> _{TEM-1} - <i>catA1</i> - <i>aphA1</i> - <i>aadA1a</i> - <i>sul1</i> - <i>sul3</i> - <i>dfrA1</i> - <i>tet(A)</i> / AMP-CHL-KAN-STR-SUL-TMP-SXT-TET	5,4 (2)	R11
pUO- <i>SbR4</i>	210	na	+	<i>bla</i> _{TEM-1} - <i>catA1</i> - <i>aphA1</i> - <i>aadA1a</i> - <i>sul1</i> - <i>sul3</i> - <i>dfrA1</i> - <i>tet(B)</i> / AMP-CHL-KAN-SUL-TMP-SXT-TET	5,4 (2)	R12
pUO- <i>SbR5</i>	200	na	+	<i>bla</i> _{TEM-1} - <i>catA1</i> - <i>aphA1</i> - <i>aadA1a</i> - <i>sul1</i> - <i>sul3</i> - <i>dfrA1</i> - <i>tet(B)</i> / AMP-CHL-KAN-SUL-TMP-SXT-TET	13,5 (5)	R12

n, número de aislamientos que presentan ese plásmido frente al número total (37) de aislamientos analizados
T, transformación; C, conjugación; +, positivo; -, negativo; na, no analizado.

- pUO-*SbR4* y pUO-*SbR5*, con tamaños aproximados de 210 y 200 Kb, se detectaron en dos y cinco aislamientos R12, respectivamente, correspondientes al periodo 1995-1997. Ambos plásmidos transfirieron todos los genes de resistencia de la cepa donadora de *S. Brandenburg* a la cepa de *E. coli* utilizada como receptora en los experimentos de conjugación. Esto se confirmó mediante amplificación de dichos genes utilizando como molde el ADN de los transconjugantes. No obstante el gen *aadA1a* no fue capaz de conferir en *E. coli* el fenotipo de resistencia a estreptomicina. De la misma manera se demostró la presencia del integrón In-*Sb* y de los transposones Tn21, Tn9 y Tn10 en ambos plásmidos.
- pUO-*SbR3*, de unas 280 Kb, se encontró en dos aislamientos con perfil R11 (LSP52/99 y LSP145/01), de los años 1999 y 2001. Los transconjugantes portadores de este plásmido presentaron todas las resistencias de la cepa parental exceptuando gentamicina (lo que llevó a postular la localización cromosómica del gen *aac(3)IV* responsable de dicha resistencia), así como el integrón In-*Sb* y los transposones Tn9, Tn21 y Tn1721.

- pUO-*SbR1* y pUO-*SbR2*, plásmidos de unas 300 Kb, presentes en un aislamiento con perfil R9 (662/01) y en dos aislamientos con perfil R10 (407/97 y 125/02). En este caso, los transconjugantes adquirieron todas las resistencias detectadas en las cepas parentales, además de *In-Sb*, *Tn21*, *Tn9* y *Tn1721*.

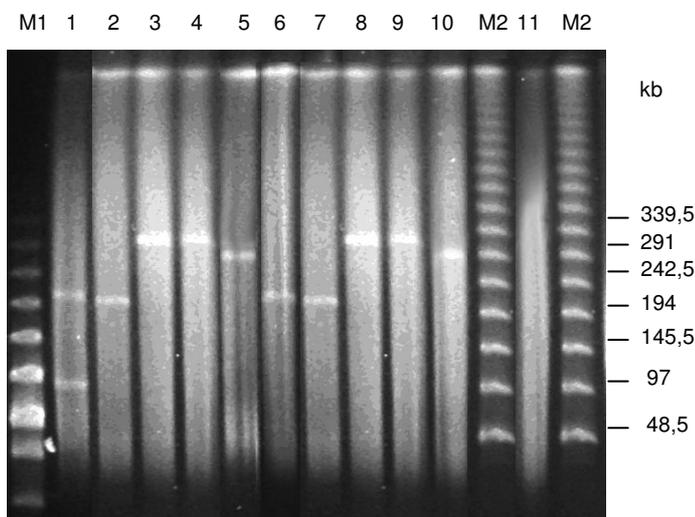


Figura 32. Análisis plasmídico de aislamientos representativos de *S. Brandenburg* y sus transconjugantes. Visualización mediante la técnica S1-PFGE. Las calles 1-5 corresponden a las cepas LSP19/97, LSP338/97, LSP662/01, LSP125/02 y LSP 145/01, respectivamente. Las calles 6-10 a los transconjugantes Tc19/97, Tc338/97, Tc662/01, Tc125/02 y Tc145/01, respectivamente. Calle 11: *E. coli* K12J53. Calles M1 y M2: marcadores de peso molecular low ladder y λ ladder

II.4.d. Estructura del integrón *In-Sb* y de los transposones detectados en plásmidos conjugativos de *S. Brandenburg*

La posible asociación de *In-Sb*, *Tn21* y *Tn9* (ver Introducción) se investigó mediante PCR convencional y anidada en cinco aislamientos representativos: LSP19/97, LSP338/97, LSP145/01, LSP662/01 y LSP125/02. Para ello se utilizaron las combinaciones de oligonucleótidos que se muestran en las tablas III.c y III.d. En estos aislamientos se observaron dos estructuras diferentes *In-Sb1* e *In-Sb2* (Fig. 33A y 34A). La primera en LSP662/01 (pUO-*SbR1*), LSP125/02 (pUO-*SbR2*) y LSP145/01 (pUO-*SbR3*) con perfiles, R9, R10 y R11, respectivamente. Estos tres perfiles comparten el gen *tet(A)*, localizado en *Tn1721*. La segunda en LSP19/97 y LSP338/97, portadores de los plásmidos pUO-*SbR4* y pUO-*SbR5*. Ambos presentan el perfil R12, que incluye el gen *tet(B)* asociado a *Tn10*. La estructura de *Tn1721* y *Tn10* en los aislamientos correspondientes se analizó también por PCR convencional y anidada (Fig. 33B y 34B; Tablas III.a y III.b).

Estructura de In-Sb1::Tn21::Tn9 y Tn1721 en LSP662/01 (pUO-SbR1), LSP125/02 (pUO-SbR2) y LSP145/01 (pUO-SbR3).

Los resultados de la asociación In-Sb1, Tn21 y Tn9 se muestran en la figura 33A.

- En el caso de la región *mer*, se obtuvieron amplicones del tamaño esperado, tanto para fragmentos de unión entre genes diferentes, como para genes individuales en reacciones de PCR anidada.
- Los fragmentos de unión entre *merE* y *urf2* y entre este último y *tniA* presentaron el tamaño esperado, lo mismo que las PCR anidadas de los genes independientes.
- La amplificación de la región comprendida entre *tniA* y *orf5* generó un fragmento de tamaño considerablemente inferior al esperado (1840 bp en vez de 5976 pb). Las reacciones de PCR anidada usando este fragmento como molde dieron resultados positivos para *orf5* y *tniA* pero no para *tniBΔ1*, *orfAB* (IS1353) e *istBA* (IS1326). La ausencia de las dos ISs se confirmó mediante secuenciación del amplicón *orf5-tniA*, donde se detectó parte de *tniBΔ1*, que presenta una delección en el extremo 3', mayor a la encontrada en Tn21.
- En cuanto a resto de In-Sb1, se confirmó la presencia de la RV: 1600 pb/*drfA1-aadA1a*, a continuación del gen de la integrasa (*intI1*). Además, la amplificación de los fragmentos *aadA1a-qacEΔ1*, *qacEΔ1-orf5* y *sul1-orf5*, usando como molde el fragmento *aadA1-orf5*, permitieron completar la estructura del integrón en las cepas analizadas.
- También se pudo establecer la asociación *intI1-tnpA* y la presencia de los genes *tnpM*, *tnpR* y *tnpA* del transposón Tn21.
- La obtención de los amplicones *merR-IS1b*, *tnpA-catA1* y *catA1-IS1b*, demostró la asociación Tn21-Tn9 (Fig. 33A).

El análisis de la estructura del transposón de tipo Tn1721 en los aislamientos *tet(A)* positivos (LSP662/01, LSP125/02 y LSP145/01) condujo a los siguientes resultados (Fig. 33B):

- Amplificación de los fragmentos de unión *mcp-tnpR*, *tnpR-tnpA* y del gen *tnpA* completo.
- También se consiguieron los fragmentos que demuestran la asociación de *tetR* con *tet(A)*, de *tet(A)* con la región intergénica y de ésta con el gen *tnpA* truncado, que se encuentra en el extremo derecho de Tn1721. Estos fragmentos se usaron como molde para amplificar genes o secuencias internas, obteniéndose en todos los casos el resultado esperado.
- Por el contrario, no se consiguió establecer la unión entre *tnpA* y *tetR*, aunque se ensayaron tres combinaciones diferentes de oligonucleótidos (Tabla III.b).

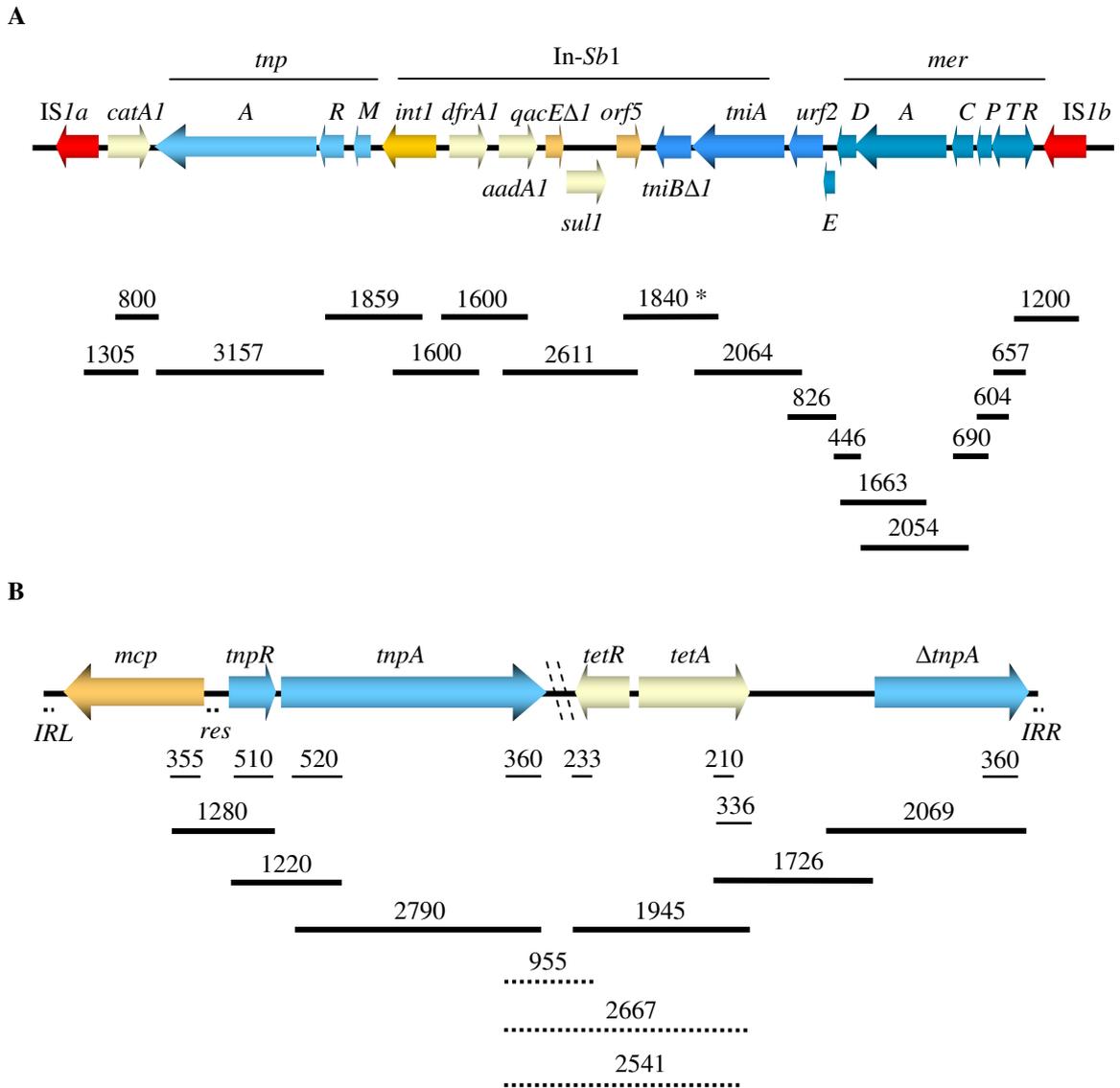


Figura 33. Organización de *In-Sb1::Tn21::Tn9* (A) y de *Tn1721* (B) en aislamientos de *S. Brandenburg*. Se muestran las amplificaciones realizadas y los tamaños (pb) de los fragmentos obtenidos mediante amplificación directa (líneas continuas mas gruesas) o anidada (líneas continuas más finas). Las líneas discontinuas representan los amplicones no conseguidos. El fragmento marcado con un asterisco fue secuenciado. Para facilitar la interpretación de las figuras, sólo se muestran algunos de los fragmentos obtenidos por PCR anidada

Estructura de In-Sb2::Tn21::Tn9 y Tn10 en LSP19/97 (pUO-SbR4) y LSP338/97 (pUO-SbR5).

La asociación de los elementos de tipo In-Sb2, Tn21 y Tn9 (Fig. 34A) se estableció en base a los siguientes resultados:

- La organización del operón *mer* aparentemente coincide con la de Tn21. Se obtuvieron bandas del tamaño esperado para todas las combinaciones probadas y las correspondientes PCR anidadas dieron resultados positivos en todos los casos.

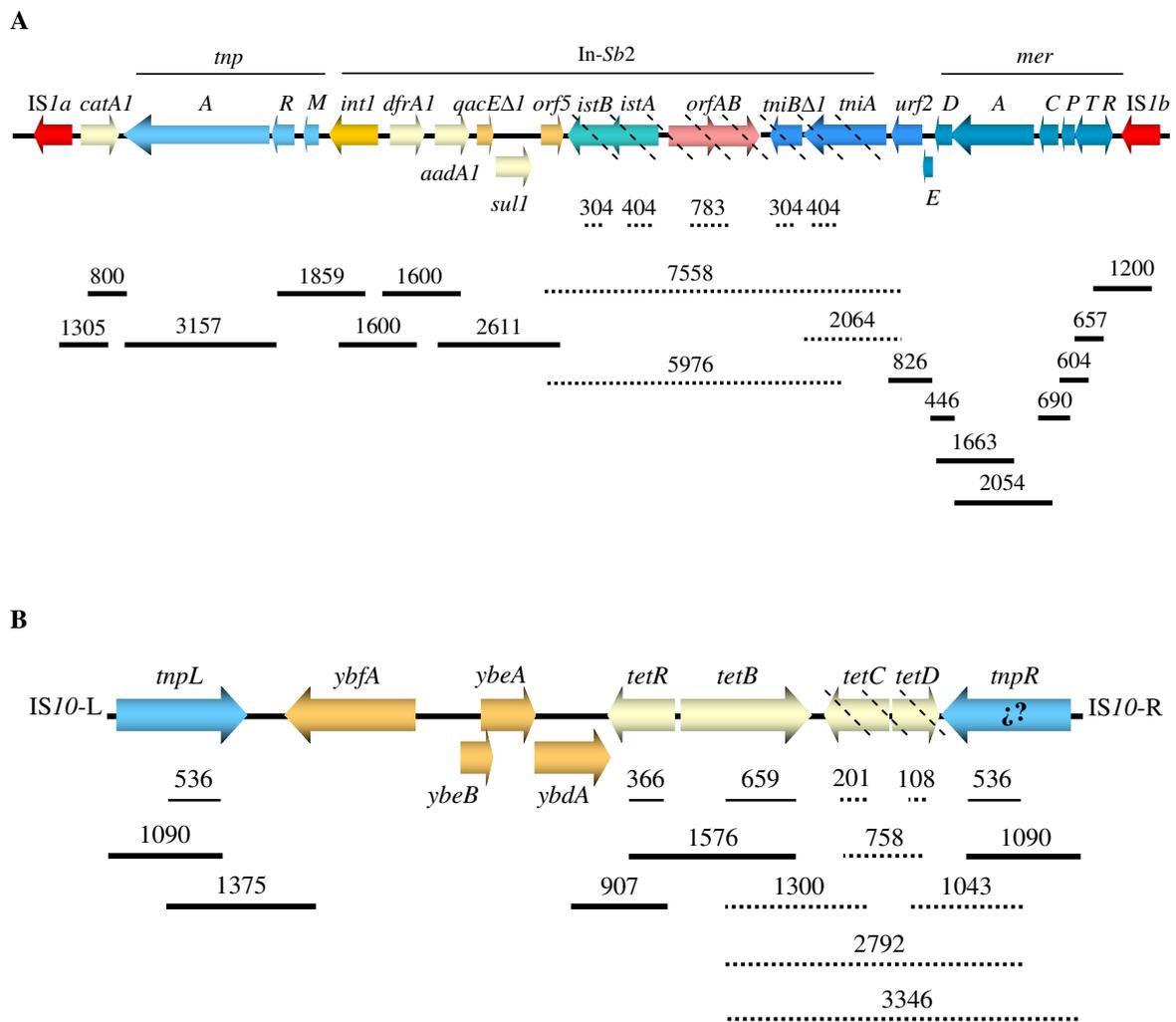


Figura 34. Organización de In-Sb2::Tn21::Tn9 (A) y de Tn10 (B) en aislamientos de *S. Brandenburg*. Las líneas continuas y discontinuas representan fragmentos obtenidos y no obtenidos, respectivamente. Los fragmentos amplificadas mediante PCR anidada no se muestran. Los números indican el tamaño esperado (pb) de los fragmentos representados

- El tamaño del fragmento de unión de *merE* a *urf2* fue el esperado y las reacciones de PCR anidada permitieron amplificar los genes de forma independiente.
- En cuanto a In-Sb2, no se consiguió la amplificación del fragmento *tniA-orf5*. Se ensayó la amplificación independiente de los genes que podrían estar incluidos en esta región: *tniA*, *tniBΔ1*, *orfAB* (IS1353) e *istAB* (IS1326), con resultado negativo. El mismo resultado se obtuvo para el fragmento que uniría *urf2* con *orf5*. Por el contrario, se obtuvieron los amplicones *aadA1-qacEΔ1*, *qacEΔ1-orf5* y *sul1-orf5*, usando como ADN molde el fragmento *aadA1-orf5*.
- La unión de *intII* (integrasa de In-Sb2) con *tnpA* (transposasa de Tn21) se llevó a cabo mediante dos amplificaciones solapantes (*intII-tnpR* y *tnpR-tnpA*), que permitieron confirmar la presencia de los genes *tnpM*, *tnpR* y *tnpA*.
- Se estableció la inserción del transposón de tipo Tn21 en Tn9, al comprobarse la contigüidad de *merR-IS1b*, *tnpA-catA1* y *catA1-IS1b*. Además, la utilización de estos fragmentos como molde permitió la amplificación de los genes independientes.

En cuanto a la estructura del transposón de tipo Tn10 (Fig. 34B), los resultados obtenidos fueron los siguientes:

- La amplificación de *IS10-tnp* generó el fragmento del tamaño esperado.
- También se obtuvieron fragmentos del tamaño adecuado en las amplificaciones *tnpL-ybdA* e *ybdA-tetR* y en las correspondientes PCR-anidadas.
- Se consiguió demostrar la asociación entre *tet(B)* y *tetR* y, utilizando el fragmento resultante como molde, amplificar cada uno de estos genes.
- Sin embargo, no se consiguió establecer la organización del transposón a partir de *tet(B)*. Así, no fue posible amplificar los genes *tetC* y *tetD* individuales, ni los fragmentos de unión *tet(B)-tetC*, *tetC-tetD*, *tetD-tnpR*, *tet(B)-tnpR*, ensayándose en este último caso dos combinaciones de oligonucleótidos (Fig. 34B).

Tabla 12. Características relevantes de los aislamientos de *S. Brandenburg* analizados en esta tesis

Perfil-R (n)	Fenotipo-R/Genotipo-R	Integrones/ Transposones	Plásmido ² / tamaño (Kb)	RAPD	PFGE	Aislamientos LSP
R0 (16)	Susceptible	-	-	S1C7	X3B3	8/95;9/95;190/95
		-	-	S2C10	X4B5	579/95
		-	-	S2C1	X7B12	227/97
		-	-	S1C3	X9B7	385/00; 484/00; 487/00; 490/00; 571/00
		-	-	-	X9B10	396/00; 422/00; 423/00;483/00
		-	-	-	X12B8	272/02
		-	-	-	S1C4	X10B8
R1 (1)	KAN/ <i>aphA1</i>	-	-	S1C3	X12B9	545/98
R2 (2)	STR/ <i>aadA1</i>	-	-	S1C8	X1B1	136/97
				S1C3	X2B4	203/95
R3 (1)	TET/ <i>tet(A)</i>	-/ Tn1721	-	S2C3	X10B8	37/02
R4 (1)	NAL-CIP/ <i>gyrA</i> ^b	-	-	S1C11	X4B5	527/95
R5 (1)	KAN-STR/ <i>aphA1-aadA1</i>	-	-	S1C1	X1B1	493/93
R6 (1)	STR-TET/ <i>aadA1-tet(A)</i>	-/ Tn1721	-	S1C7	X3B3	34/05
R7 (1)	CHL-KAN-STR/ <i>catA1-aphA1-aadA1</i>	-	-	S1C1	X1B1	497/93
R8 (1)	STR-TET-TMP/ <i>aadA1-tet(A)-dfrA1</i>	-/ Tn1721	-	S2C5	X8B6	26/00
R9 (1)	AMP-CHL-STR-SUL-TMP-TET/ <i>bla</i> _{TEM} - <i>catA1-aadA1-sul1-sul3-dfrA1-tet(A)</i>	In- <i>Sb1</i> / Tn21, Tn9, Tn1721	pUO- <i>SbR1</i> / 300	S1C6	X2B4	662/01 ^c
R10 (2)	AMP-CHL-KAN-STR-SUL-TMP-TET/ <i>bla</i> _{TEM} - <i>catA1-aphA1-aadA1-sul1-sul3-dfrA1-tet(A)</i>	In- <i>Sb1</i> / Tn21, Tn9, Tn1721	pUO- <i>SbR2</i> / 300	S1C2	X7B11	407/97
				S1C1	X2B4	125/02 ^c
R11 (2)	AMP-CHL-GEN-KAN-STR-SUL-TMP-TET/ <i>bla</i> _{TEM} - <i>catA1-aac(3)IV-aphA1-aadA1-sul1-sul3-dfrA1-tet(A)</i>	In- <i>Sb1</i> / Tn21, Tn9, Tn1721	pUO- <i>SbR3</i> / 280	S1C2	X11B13	52/99
				S1C1	X2B14	145/01 ^c
R12 (7)	AMP-CHL-KAN-STR-SUL-TMP-TET/ <i>bla</i> _{TEM} - <i>catA1-aphA1-aadA1-sul1-sul3-dfrA1-tet(B)</i>	In- <i>Sb2</i> / Tn21, Tn9, Tn10	pUO- <i>SbR4</i> / 210	S2C8	X5B1	20/97
				S2C9	X6B1	19/97 ^c
			pUO- <i>SbR5</i> / 200	S1C1	X1B2	24/95
				S1C1	X1B1	202/95
				S1C11	X4B5	379/95
				S1C8	X5B1	331/96
				S2C6	X7B11	338/97 ^c

^apUO-*SbR*: Plásmido de la Universidad de Oviedo-*Salmonella* Brandenburg Resistencia; ^bMutación en el gen *gyrA* (GAC a GGC), cambiando el Asp-87 a Gly;

^caislamientos seleccionados como representativos del correspondiente perfil-R.

Estos resultados se han recogido en la publicación:

- **Martínez, N.,** M. C. Mendoza, I. Rodríguez, S. Soto, M. Bances y M. R. Rodicio. 2007. Detailed structure of integrons and transposons carried by large conjugative plasmids responsible for multidrug resistance in diverse genomic types of *Salmonella enterica* serovar Brandenburg. J. Antimicrob. Chemother. En prensa.

Y en la comunicación:

- **Martínez, N.,** M. A. González-Hevia, M. Rodríguez, M. R. Rodicio y M. C. Mendoza. 2005. Resistencia a antimicrobianos, integrones y plásmidos en aislamientos clínicos de *Salmonella enterica* serotipo Brandenburg. XX Congreso Nacional de Microbiología (SEM). Cáceres.

III. Epidemiología Molecular de *Salmonella enterica* serotipo Ohio en el Principado de Asturias

III.1. DATOS EPIDEMIOLÓGICOS

Los aspectos epidemiológicos de la salmonelosis por *S. Ohio* en el Principado de Asturias incluyendo la evolución temporal y espacial de los episodios, la presentación clínica y epidemiológica de los casos, así como el sexo y edad de los pacientes afectados se recopilan en la tabla I.c (Anexo I).

Tabla 13. Dispersión espacial y temporal de los aislamientos de *S. Ohio* en el Principado de Asturias (1991-2005)

Año(s)	Total	Áreas Sanitarias afectadas (nº aislamientos)								Presentación de los casos	
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	Clínica:casos	Epidemiología:casos
1991-92	5			5						DA:1 DR:1	CA
1993	3			1	1	1				DA:3	CA
1994	8	1		4	1	1		1		DA:7 AR:1	CA
1995	5	1				3			1	DA:3 DR:1	CA:2 BF:2
1996	3				1	2				DA:3	CA
1998	9			1	2	6				DA:7 DR:1	CA
2000	1				1					DA:1	CA
2001	3				2			1		DA:3	CA
2002	3				3					DA:3	CA
2003	14		2		3	6	3			DA:14	CA
2005	1					1				DA:1	CA
1991-05	55	2	2	11	14	20	4	1	1		

AR: agua residual; DA: diarrea aguda; DR: diarrea recurrente (periodo \geq 1 mes);
CA: caso aislado; BF: brote familiar (2 afectados y 3 aislamientos)

Durante el periodo de estudio (1991-2005) el LSP registró 55 aislamientos de *S. Ohio* (Tabla 13), la mayoría en las áreas sanitarias V, IV y III (20, 14 y 11, respectivamente). De ellos, 54 se obtuvieron de muestras clínicas, en concreto de heces de pacientes con diarrea aguda (46 aislamientos) o con diarrea recurrente (8). El aislamiento restante procede de un agua residual. Todos los aislamientos originaron casos aislados de gastroenteritis, excepto tres. Estos últimos se corresponden con un brote familiar registrado en el área sanitaria V (en 1995) que involucró a dos niños, de un año y un mes, respectivamente. El más pequeño sufrió una salmonelosis persistente, con cuadro recurrente, aislándose *Salmonella* a partir de dos muestras de heces con un intervalo de tres meses. Durante el periodo de estudio se detectaron otros dos casos de diarrea recurrente. El primero corresponde a un niño de seis meses, de cuyas heces se recuperaron cuatro aislamientos en cuatro meses consecutivos (área III, octubre 1991 a enero 1992), mientras que el segundo afectó a

una niña de siete meses, detectándose *Salmonella* en muestras de heces en dos meses consecutivos (área V, 1998).

En cuanto a la estacionalidad de la salmonelosis por *S. Ohio*, en el periodo frío (noviembre a abril) se registraron 23 episodios mientras en el cálido (mayo a octubre) fueron 26. No se observaron diferencias en función del sexo de los pacientes (25 casos en hombres y 24 en mujeres), pero sí se dio una mayor incidencia en edades tempranas de la vida. El 45,2% (19) de los episodios en los que consta la edad del paciente afectaron a niños menores de dos años y otro 16,67% (7) tuvo lugar en niños de edades comprendidas entre los tres y los 13 años. Por otro lado, el 21,4% (9) y el 16,7% (7) corresponden a personas de 14-60 años y a mayores de 60 años, respectivamente. En siete episodios no consta la edad del paciente.

III.2. TIPIFICACIÓN MEDIANTE MÉTODOS GENOTÍPICOS

III.2.a. RAPD

Se utilizaron también los iniciadores aleatorios S y C. El primero diferenció dos perfiles de bandas (S1 y S2) entre las cepas asignadas al serotipo Ohio (Fig. 35A). S1, presentado por 54 aislamientos y definido por cinco bandas con tamaños comprendidos entre 2.000 y 700 pb, fue claramente mayoritario. El perfil S2, sólo encontrado en un aislamiento, incluye seis bandas, manteniéndose las cinco del perfil prevalente y apareciendo una nueva de 600 pb. Por último, el perfil de la cepa control, *S. Typhimurium* ATCC 14028, claramente distinto de los anteriores, consta de tres fragmentos comprendidos entre 1.800 y 500 pb.

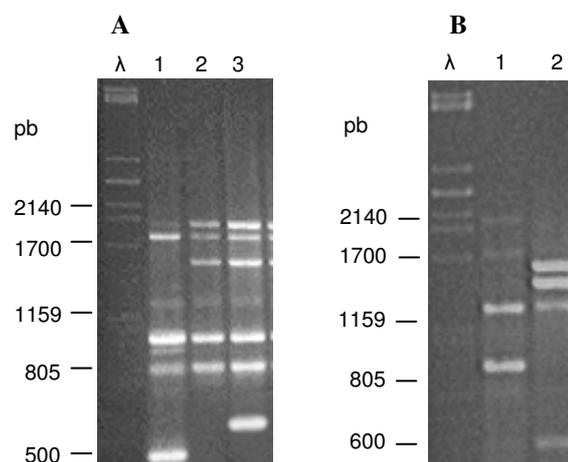


Figura 35. Tipificación RAPD de los aislamientos de *S. Ohio*. **(A)** Iniciador S. Calle λ: ADN del fago λ digerido con *Pst*I. Calle 1: Typhimurium ATCC 14028. Calle 2: perfil S1. Calle 3: perfil S2. **(B)** Iniciador C. Calle λ: ADN del fago λ digerido con *Pst*I. Calle 1: Typhimurium ATCC 14028. Calle 2: perfil C1

En el caso de los aislamientos de *S. Ohio*, el iniciador C detectó un único perfil (C1), definido por cuatro bandas de tamaños comprendidos entre 1.600 y 600 pb. Nuevamente, la cepa de referencia presentó un perfil claramente diferenciado, con dos bandas entre 1.300 y 900 (Fig. 35B).

III.2.b. Macrorrestricción-PFGE

El análisis de los aislamientos de *S. Ohio* mediante digestión del genoma con *XbaI* reveló la existencia de 11 perfiles (X1 a X11), formados por 12-18 fragmentos con tamaños entre 20 y 1.135 Kb (Fig. 36A). La mayoría de los aislamientos (32 aislamientos, 58,2%) mostraron el perfil X1. Los siguientes en frecuencia fueron X3 y X11 presentados por cinco y cuatro aislamientos, respectivamente. Los demás perfiles se detectaron en un máximo de tres aislamientos.

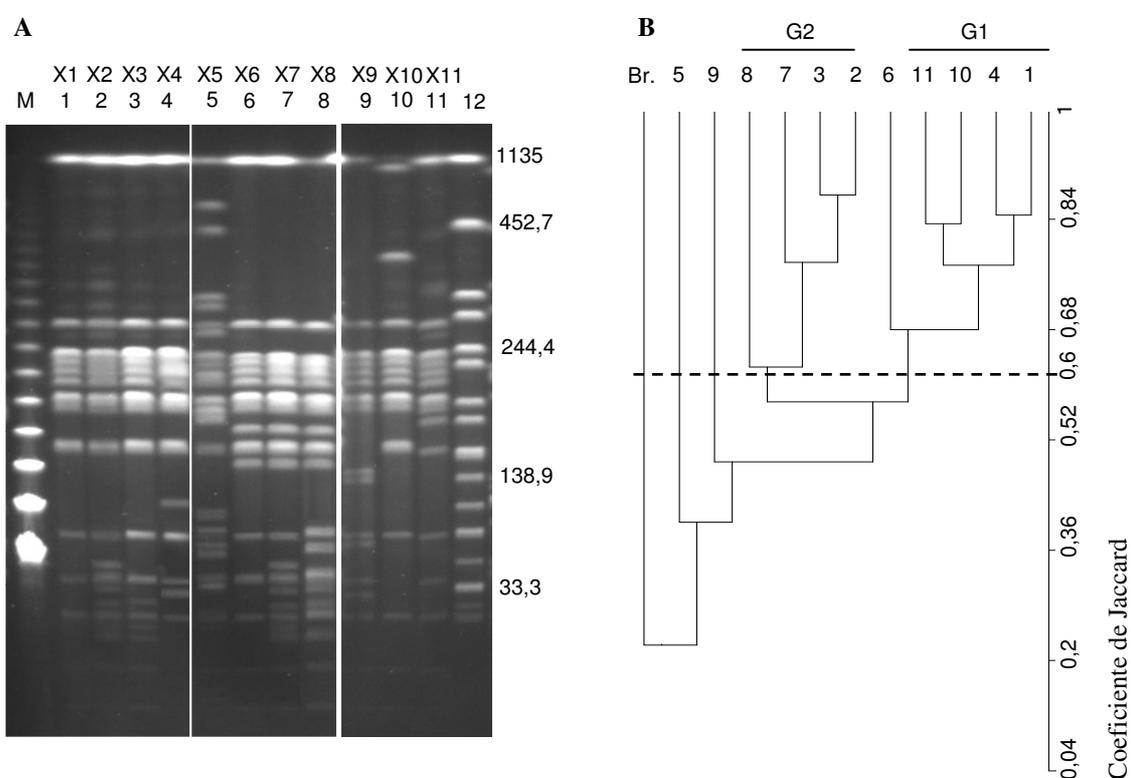


Figura 36. (A) Perfiles generados por *XbaI*-PFGE a partir de *S. Ohio*. Calles 1-11: perfiles de X1-B11. Calle 12: *S. Braenderup* H9812. Calle M: marcador de peso molecular λ ladder. (B) Dendrograma de similitud basado en los perfiles *XbaI*-PFGE

A un coeficiente de similitud de $S = 0,60$ se observan dos agrupaciones (G1 y G2) y dos ramas sueltas. G1 reúne los perfiles X1, X4, X6, X10 y X11 ($S \geq 0,68$), que comprenden el 74,5% de los aislamientos. G2 ($S \geq 0,63$) incluye los perfiles X2, X3, X7 y X8, con 18,2% de los aislamientos. X9 (un aislamiento) y X5 (5,5%; tres aislamientos), constituyen las ramas

independientes. *S. Braenderup* (cepa fuera de grupo) tiene un coeficiente de similitud $S = 0,21$ respecto a *S. Ohio* (Fig. 36B).

La macrorrestricción genómica con la endonucleasa *BlnI*, al igual que sucedía con el enzima anterior, mostró un perfil claramente prevalente, denominado B2, en el que se engloban 31 aislamientos (56,4%) del periodo comprendido entre 1992 y 2005. B1 y B5, con nueve (16,4) y seis (10,9%) aislamientos respectivamente, se sitúan a continuación. El perfil B1 aparece en cuatro aislamientos de 1991-1992 (en realidad una única cepa, al proceder del mismo paciente en meses sucesivos), el único aislamiento de 2000 y cuatro aislamientos de 2003. El perfil B5 se encontró en el periodo 1994-2001. El perfil B4 lo mostraron cinco aislamientos (9,1%), cuatro de ellos de 1994 y uno de 1996. Por último, los perfiles B3 y B6 sólo incluyen dos aislamientos cada uno. A diferencia de lo que sucedía en el caso de *XbaI*, los perfiles *BlnI* presentaron un número bajo de fragmentos, 7-11, con tamaños que fueron desde 33 hasta 1.135 Kb (Fig. 37A).

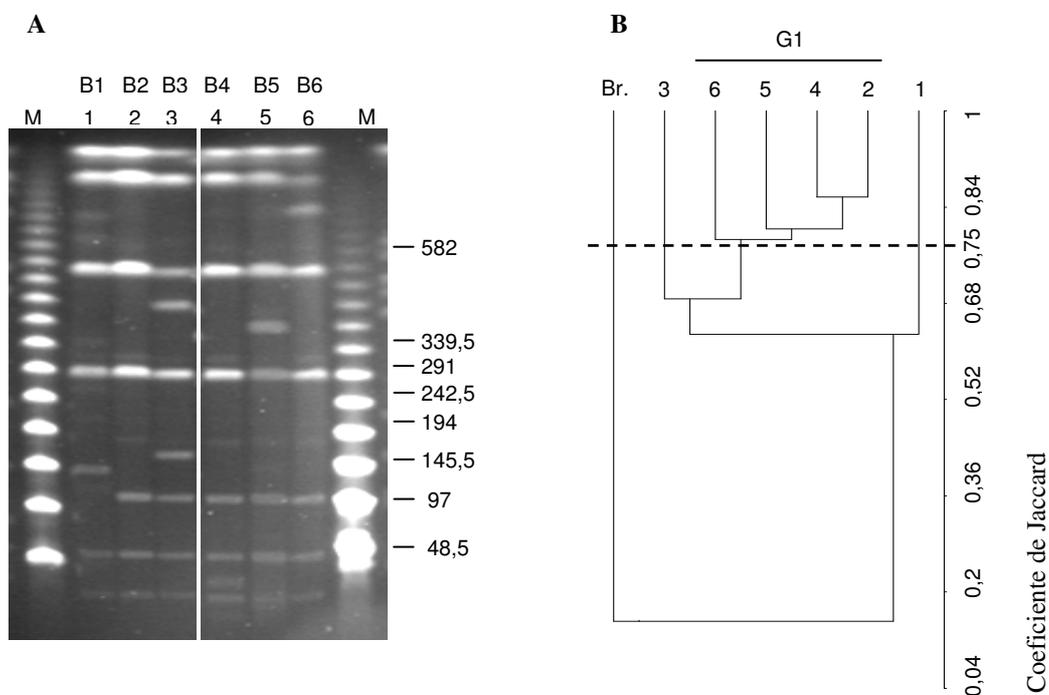


Figura 37. (A) Perfiles *BlnI*-PFGE generados por los aislamientos de *S. Ohio*. Calles 1-6: perfiles de B1-B6. Calle M: marcador de peso molecular λ ladder. (B) Dendograma de similitud derivado de la comparación de los perfiles *BlnI*-PFGE

En cuanto a la interpretación del dendograma de similitud, estableciendo el punto de corte en $S \geq 0,75$ se puede definir una agrupación (G1), donde se sitúan los perfiles B2, B4, B5 y B6 (80% de los aislamientos) y dos ramas formadas por los aislamientos B3 (3,6%) que se relaciona

con C1 a un valor de $S = 0,69$ y B1 (16,4%), más alejada. *S. Braenderup* tiene un coeficiente de similitud $S = 0,15$ respecto a *S. Ohio* (Fig. 37B).

Resumiendo, el perfil RAPD S1C1 agrupó al 98,2% de los aislamientos de *S. Ohio*, mientras un único aislamiento (LSP325/94) presentó el perfil S2C1. Combinando estos resultados con los obtenidos mediante macrorrestricción-PFGE, se detecta un perfil claramente mayoritario S1C1/X1B2, presentado por el 47,3% de los aislamientos. El resto de los perfiles engloba entre cinco y un aislamiento (Tabla 14).

Tabla 14. Correlación de perfiles RAPD y PFGE

RAPD	PFGE	Cepas LSP
S1C1	X1B1	811/91; 852/91 908/91; 11/92
	X1B2	138/92; 127/95; 170/95; 302/95; 489/95; 570/95; 34/98; 72/98; 74/98; 90/98; 163/98; 267/98; 68/02; 148/02; 408/02; 6/03; 9/03; 10/03; 19/03; 20/03; 21/03; 40/03; 135/03; 550/03; 705/03; 290/05
	X1B3	12/93; 264/93;
	X2B2	191/98;
	X3B4	334/94; 336/94 ; 386/94; 131/96
	X4B2	229/93
	X5B2	50/94; 139/94; 309/94
	X6B5	461/94; 75/98
	X7B5	209/98; 26/01
	X8B5	199/96; 557/96
	X9B1	358/00
	X10B6	301/01; 592/01
	X11B1	7/03; 14/03; 26/03; 27/03
	S2C1	X3B4

III.3. RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS

El análisis de la susceptibilidad a antimicrobianos de los aislamientos de *S. Ohio* permitió establecer 12 perfiles de resistencia (R0-R11) y analizar su evolución temporal. El perfil mayoritario fue R0, presentado por 36 aislamientos (65,5% de la serie) susceptibles a todos los agentes utilizados y recuperados a lo largo de todo el periodo de estudio. El siguiente perfil en frecuente fue R2, con una única resistencia a sulfadiacina, que apareció en cinco aislamientos (9,1%) del periodo 1991-1998. También se encontraron seis perfiles MDR (R6, R7, R8, R9, R10 y R11, con resistencia a cuatro o más antimicrobianos no relacionados), que en conjunto representan el 18,2% de la serie, correspondiente al periodo 1994-2001. Los perfiles restantes incluyeron un

único aislamiento (Tabla 16). En cuanto a las resistencias individuales, 17 aislamientos (30,9%) fueron resistentes a sulfadiacina, 11 (20%) a estreptomicina, diez (18,2%) a tetraciclina y nueve (16,4%) a trimetoprim.

III.4. GENES Y ELEMENTOS GENETICOS IMPLICADOS EN LA RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS

III.4.a. Identificación de determinantes de resistencia a antimicrobianos.

El uso de oligonucleótidos específicos para los genes *aac(3)II*, *aac(3)IV*, *aadA1a*, *aphAI*, *catA1*, *cmlA*, *flo-R*, *strA*, *strB*, *sul1*, *sul2*, *sul3*, *dfrA1*, *dfrA12*, *bla_{OXA-1}*, *bla_{PSE-1}*, *bla_{TEM-1}*, *tet(A)*, *tet(B)* y *tet(G)* permitió identificar los determinantes genéticos más relevantes para las resistencias observadas (Tabla 16). En resumen:

- Todos los aislamientos resistentes a ampicilina fueron positivos para *bla_{TEM-1}* y negativos para *bla_{PSE-1}* y *bla_{OXA-1}*.
- Todos los aislamientos resistentes a cloranfenicol y kanamicina presentaron amplicones del tamaño adecuado con iniciadores específicos para *aphAI* y *catA1*, respectivamente. Por el contrario, las amplificaciones de *cmlA* y *floR* dieron un resultado negativo.
- Todos los aislamientos resistentes a sulfadiacina fueron positivos para *sul1* y negativos para los otros genes ensayados (*sul2* y *sul3*).
- Todos los aislamientos resistentes a tetraciclina presentaron el gen *tet(B)*, pero no *tet(A)* ni *tet(G)*.
- Todos los aislamientos resistentes a trimetoprim dieron amplicones del tamaño adecuado con los iniciadores específicos para *dfrA1*.
- En cuanto a la resistencia a gentamicina, tres aislamientos (LSP334/94, LSP336/94 y LSP386/94) fueron positivos para el gen *aac(3)II*, mientras que uno (LSP14/03), lo fue para *aac(3)IV*.
- De un total de 11 aislamientos resistentes a estreptomicina, cuatro dieron amplificación positiva para *strA/B* y siete para *aadA1a*.

III.4.b. Detección de integrones y transposones.

En ninguno de los aislamientos de este serotipo se encontraron integrones de clases 2 o 3, pero sí integrones de clase 1. En concreto, seis aislamientos MDR (perfiles R9, R10 y R11) presentaron el integrón In-So1 [1600 pb/*aadA1a* y *dfrA1*], responsable de la resistencia a

estreptomicina y trimetoprim. En cuanto a la presencia de transposones (Tabla II.b) se obtuvieron los siguientes resultados:

- Todos los aislamientos resistentes a ampicilina presentaron amplificación positiva para la transposasa del Tn3, donde se ha encontrado el gen *bla*_{TEM-1}.
- Todos los aislamientos positivos para In-*So1* lo fueron también para el gen *tnpR*, que codifica la resolvasa de Tn21. Sin embargo, solamente dos (LSP191/98 y LSP26/01) dieron amplificación positiva para el gen *tnpA* (transposasa).
- Los dos aislamientos resistentes a cloranfenicol generaron el amplicón del tamaño adecuado con iniciadores específicos para la secuencia de inserción *IS1* y para el gen *catA1*, ambos pertenecientes a Tn9. Se trata de los mismos aislamientos que habían dado un resultado positivo para el gen *tnpA* de Tn21 (LSP191/98 y LSP26/01).
- El gen *tetR*, que codifica el represor de *tet(B)* específico de Tn10, se consiguió amplificar a partir de todos los aislamientos resistentes a tetraciclina, obtenidos con posterioridad a 1996. Estos aislamientos habían sido también positivos para *tet(B)*.

III.4.c. Análisis de plásmidos

Mediante la técnica S1-PFGE se detectaron cuatro tipos de plásmidos de gran tamaño en los aislamientos positivos para In-*So1* (Fig. 38A; Tabla 15): pUO-*SoR1* (145 Kb) apareció en tres aislamientos de 1996 con perfil R9 (LSP131/96, LSP199/96 y LSP557/96), pUO-*SoR2* (160 Kb) en un aislamiento de 1998 con perfil R10 (LSP209/98), pUO-*SoR3* (180 Kb) en otro aislamiento del mismo año (LSP191/98) con perfil R11 y pUO-*SoR4* (190 Kb) en un único aislamiento de 2001 (LSP 26/01) con perfil R11. La presencia del integrón de clase 1 en los cuatro plásmidos anteriores se comprobó mediante hibridación de los perfiles S1-PFGE con una sonda específica para la RV del mismo (Fig. 38B).

Además, se llevaron a cabo experimentos de conjugación actuando como donadores aislamientos de *S. Ohio* portadores de cada uno de los plásmidos y como receptor *E. coli* K12 J53 (Tabla 15). pUO-*SoR1* y pUO-*SoR2*, a pesar de su tamaño, no pudieron ser transferidos. Por el contrario, pUO-*SoR3* y pUO-*SoR4* fueron conjugativos, aportando a la bacteria receptora todos los determinantes de resistencia, el integrón y los transposones detectados en los aislamientos donadores. Este hecho se comprobó en base al perfil de resistencia de los transconjugantes y mediante amplificación por PCR de genes o secuencias relevantes, utilizando como molde el ADN de estos últimos. Los plásmidos-R no conjugativos serán caracterizados con mayor detalle en el futuro.

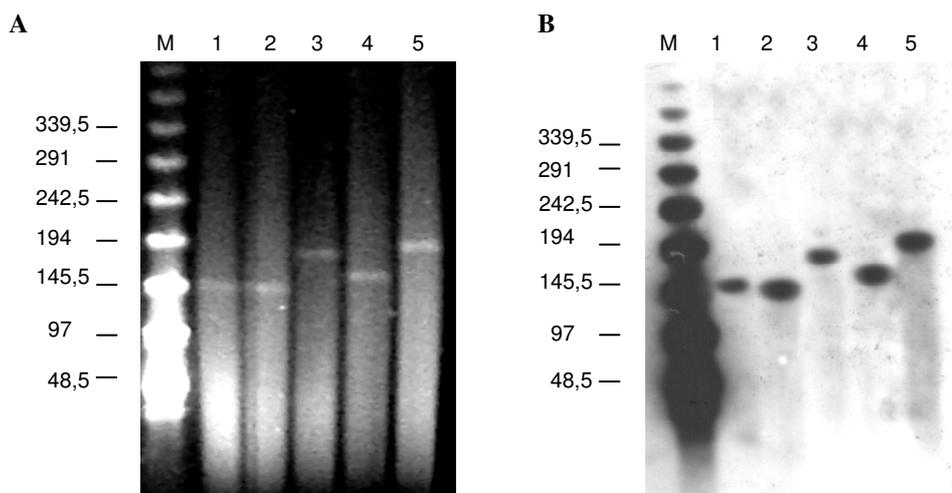


Figura 38. (A) Detección de plásmidos-R en aislamientos de *S. Ohio*. (B) Hibridación del panel A con la RV del integrón de clase 1. Calles 1-5: LSP131/96, LSP557/96, LSP191/98, LSP209/98 y LSP26/01, respectivamente. Calle M: marcador de peso molecular λ ladder

Tabla 15. Características de los plásmidos de resistencia detectados en *S. Ohio*

Plásmido	Kb	Transferencia a <i>E. coli</i>		Genes-R adquiridos/Fenotipo-R conferido	% (n)	Perfil-R
		T	C			
pUO- <i>SoR1</i>	145	-	-	-	5,5 (3)	R9
pUO- <i>SoR2</i>	160	-	-	-	1,8 (1)	R10
pUO- <i>SoR3</i>	180	na	+	CHL-KAN-STR-SUL-TET-TMP/ <i>catA1-aphA1-aadA1-sul-,tet(B)-dfrA1</i>	1,8 (1)	R11
pUO- <i>SoR4</i>	190	na	+	CHL-KAN-STR-SUL-TET-TMP/ <i>catA1-aphA1-aadA1-sul1-tet(B)-dfrA1</i>	1,8 (1)	R11

n, número de aislamientos que presentan ese plásmido frente al número total (55) de aislamientos analizados

T, transformación; C, conjugación; -, negativo; na, no analizado.

III.4.d. Estructura del integrón y de los transposones de tipo *Tn21*, *Tn9* y *Tn10*.

Teniendo en cuenta la asociación de integrones de clase 1 con *Tn21*, se estudió la estructura de este transposón en cuatro aislamientos representativos: LSP557/96 (perfil R9; pUO-*SoR1*), LSP209/98 (perfil R10; pUO-*SoR2*), LSP191/98 (perfil R11; pUO-*SoR3*) y LSP26/01 (perfil R11; pUO-*SoR4*). En los dos últimos, resistentes a cloranfenicol, se demostró, además, la unión de *Tn21* con *Tn9*. Los cuatro aislamientos presentaron el gen *tet(B)* asociado al transposón *Tn10* cuya estructura también se analizó. Para ello se emplearon las combinaciones de oligonucleótidos que se muestran en las tablas III.a, III.c y III.d, encontrándose dos organizaciones diferentes en el caso de *Tn21* y la misma en *Tn10*.

Estructura de In-So1::Tn21 en los aislamientos LSP557/96 y LSP209/98.

Los resultados relativos a In-So1::Tn21 se representan en la figura 39A.

- En estos dos aislamientos, la estructura del operón *mer* coincidió con la descrita para Tn21. Así, todas las combinaciones probadas en esta región y las correspondientes PCR anidadas originaron los fragmentos del tamaño esperado. También se consiguió amplificar el fragmento de unión *merE-urf2* y los genes independientes.
- Por el contrario, fue imposible amplificar el fragmento *urf2-tniA*, los genes *tniA* y *tniBΔ1* individuales, los genes *istA* e *istB* de IS1353, los genes *orfA* y *orfB* de IS1326 y el fragmento solapante *urf2-orf5*.
- A partir de *orf5*, la estructura del integrón coincidió con la esperada, obteniéndose los amplicones correspondientes a *qacEΔ1* y *sulI* (segmento 3'CS), *drfA1* y *aadA1a* (RV 1600 pb) e *intI1* (segmento 5'CS). El orden de dichos genes se confirmó mediante amplificación de fragmentos solapantes.
- Finalmente, se demostró la unión *intI1-tnpR* pero no *tnpR-tnpA*. Tampoco se consiguió amplificar el gen *tnpA* individual.

Estructura de In-So1::Tn21::Tn9 en los aislamientos LSP191/98 y LSP26/01

En cuanto a la organización de In-So1::Tn21::Tn9 (Fig. 39B):

- Al igual que los aislamientos anteriores, estos últimos contienen un operón *mer* intacto, comprobándose, además, la unión de *merE* con *urf2* y la presencia de los dos genes individuales. La estructura del integrón también coincide. Así, mediante amplificaciones solapadas y PCR anidada se confirmó la presencia de la región comprendida entre *intI1* y *orf5*, pero no entre este último y *urf2*.
- Sin embargo, en estos aislamientos se consiguió amplificar el fragmento comprendido entre *intI1* y *tnpA* y se estableció la presencia y contigüidad de los genes *tnpM*, *tnpR* y *tnpA*.
- Se demostró, además, la presencia de IS1 y *catA1*, secuencias específicas de Tn9, y se amplificaron fragmentos que demostraron la asociación de *merR* e IS1*b*, de *tnpA* y *catA1* y de *catA1* e IS1*a*. Utilizando como molde cada uno de estos fragmentos, se amplificaron los genes independientes.

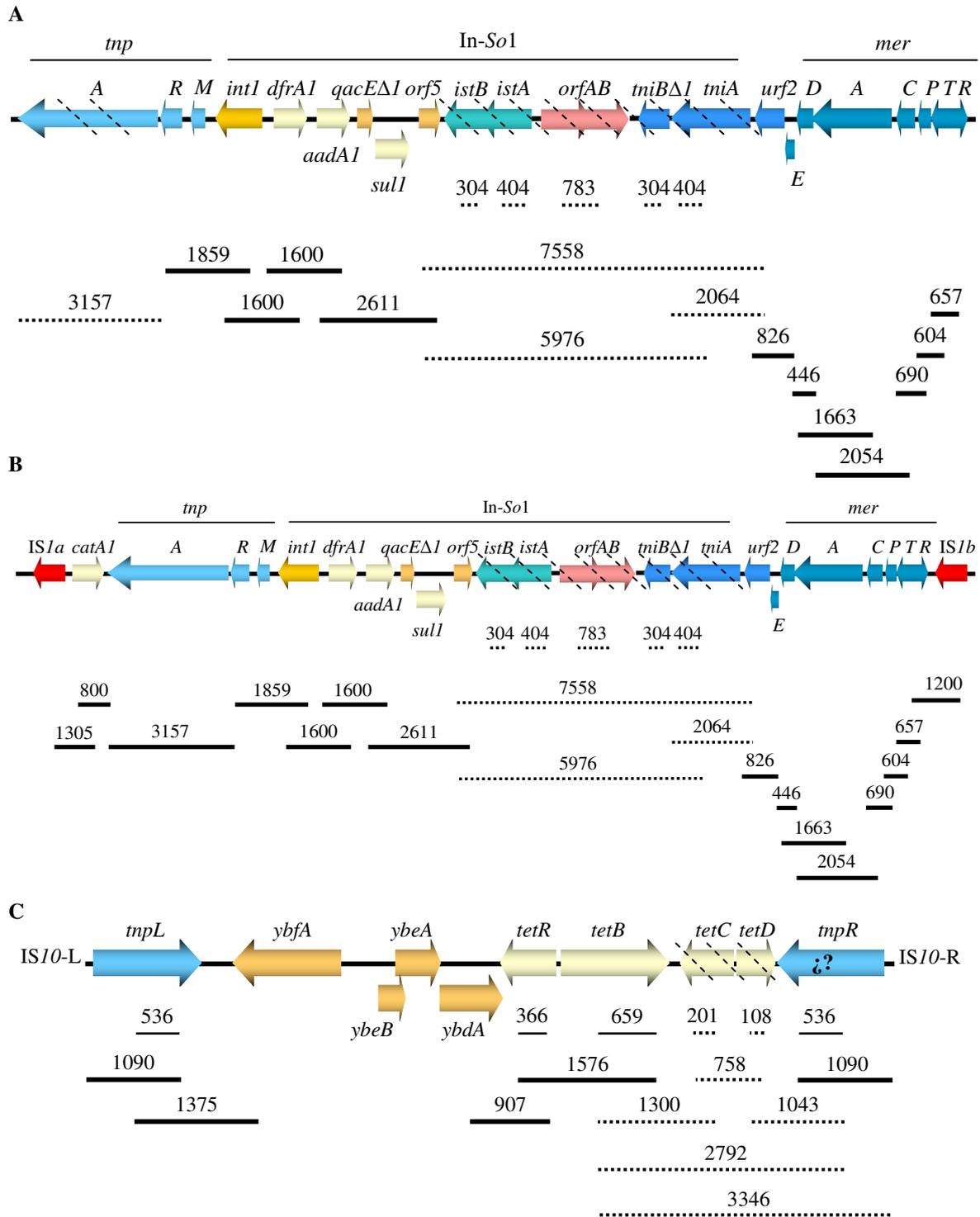


Figura 39. Organización de In-Sol1::Tn21 en LSP557/96 y LSP209/98 (**A**) y en LSP191/98 y LSP26/01 (**B**) y de Tn10 (**C**) en LSP557/96, LSP191/98, LSP209/98 y LSP26/01. Se muestran las amplificaciones realizadas y los tamaños (pb) de los fragmentos obtenidos. Con líneas discontinuas se señalan las amplificaciones fallidas. Solo se indican algunas PCR anidadas

Estructura de Tn10 en los aislamientos LSP557/96, LSP191/98, LSP209/98 y LSP26/01

Respecto a la estructura del transposón Tn10, se obtuvieron los siguientes resultados (Fig. 39C):

- Se consiguió la amplificación del fragmento de unión IR-*tnp* de IS10 y también del gen *tnp* independiente, mediante PCR anidada utilizando como molde el fragmento anterior. Así se demuestra la presencia de al menos una copia de IS10.
- También se consiguió establecer la asociación entre *tet(B)* y *tetR* y de cada uno de estos genes por PCR anidada.
- Se obtuvieron fragmentos del tamaño adecuado en las amplificaciones *tetR-ybdA* e *ybfA-tnpL* y en las correspondientes PCR-anidadas, lo que confirma la presencia de IS10-L.
- Sin embargo, no se pudo obtener el fragmento de unión *tet(B)-tnpR*, aunque se ensayaron distintas combinaciones de oligonucleótidos. Tampoco fue posible amplificar los genes *tetC* y *tetD* individuales, ni los fragmentos solapantes *tet(B)-tetC*, *tetC-tetD*, *tetD-tnpR*.

Tabla 16. Características relevantes de los aislamientos de *S. Ohio* analizados en esta tesis

Perfil-R (n)	Fenotipo-R/Genotipo-R	Integrones/Transposones	Plásmido ^a / (Kb)	RAPD	PFGE	Aislamientos LSP
R0 (36)	Susceptible	-	-	S1C1	X1B1 X1B2	811/91, 852/91, 908/91, 11/92, 138/92, 489/95, 570/95, 34/98, 72/98, 74/98, 90/98, 163/98, 267/98, 68/02, 148/02, 408/02, 6/03, 9/03, 10/03, 19/03, 20/03, 21/03, 40/03, 135/03, 550/03, 705/03, 290/05
					X1B3 X5B2 X10B6 X11B1	12/93, 264/93 50/94, 139/94 301/01, 592/01 7/03, 26/03, 27/03
R1 (1)	STR/ <i>aadA1</i>	-	-	S1C1	X9B1	358/00
R2 (5)	SUL/ <i>sul1</i>	-	-	S1C1	X5B2 X1B2 X6B5	309/94; 127/95, 170/95; 302/95 75/98
R3 (1)	GEN-KAN/ <i>aac(3)IV-aphA1</i>	-	-	S1C1	X11B1	14/03
R4 (1)	SUL-TMP/ <i>sul1-dfrA1</i>	-	-	S1C1	X6B5	461/94
R5 (1)	STR-SUL-TMP/ <i>strA/B-sul1-dfrA1</i>	-	-	S1C1	X4B2	229/93
R6 (1)	STR-SUL-TET-TMP/ <i>strA/B-sul1-tet(B)-dfrA1</i>	-/-	-	S2C2	X3B4	325/94
R7 (1)	AMP-GEN-SUL-TET/ <i>bla_{TEM}-aac(3)II-sul1-tet(B)</i>	-/Tn3, -	-	S1C1	X3B4	336/94
R8 (2)	AMP-GEN-STR-SUL-TET/ <i>bla_{TEM}-aac(3)II-strA/B-sul1-tet(B)</i>	-/Tn3, -	-	S1C1	X3B4	334/94; 386/94
R9 (3)	AMP-STR-SUL-TET-TMP/ <i>bla_{TEM}-aadA1-sul1-tet(B)-dfrA1</i>	In- <i>So1</i> / Tn3, Tn21, Tn10	pUO- <i>SoR1</i> (145)	S1C1	X3B4 X8B5	131/96 199/96; 557/96^b
R10 (1)	AMP-KAN-STR-SUL-TET-TMP/ <i>bla_{TEM}-aphA1-aadA1-sul1-tet(B)-dfrA1</i>	In- <i>So1</i> / Tn3; Tn21; Tn10	pUO- <i>SoR2</i> (160)	S1C1	X7B5	209/98^b
R11 (2)	CHL-KAN-STR-SUL-TET-TMP/ <i>cata1-aphA1-aadA1-sul1-tet(B)-dfrA1</i>	In- <i>So1</i> /Tn9, Tn21; Tn10	pUO- <i>SoR3</i> (180 Kb)	S1C1	X2B2	191/98^b
			pUO- <i>SoR4</i> (190 Kb)		X7B5	26/01^b

^apUO-SoR: plásmido de la Universidad de Oviedo-*Salmonella Ohio* Resistencia.

^baislamientos seleccionados como representativos del correspondiente perfil-R.

Parte de los resultados del periodo 1991-1998 se recogen en el artículo:

- Soto, S. M., **N. Martínez**, B. Guerra, M. A. González-Hevia y M. C. Mendoza. 2000. Usefulness of genetic typing methods to trace epidemiologically *Salmonella* serotype Ohio. *Epidemiol. Infect.* **125**: 481-9.

El resto se incluyen en el artículo en preparación:

- **Martínez, N.**, M. C. Mendoza, I. Rodríguez, R. Rodicio y M. R. Rodicio. Resistance genes, integrons and/or transposons carried by large plasmids of *Salmonella enterica* serovar Ohio.

IV. Perfiles de Genes de Virulencia en aislamientos de los serotipos Hadar, Brandenburg y Ohio

IV.1. GENES ASOCIADOS A ISLAS DE PATOGENICIDAD

En los tres serotipos se investigó, en primer lugar, la presencia de secuencias localizadas en distintas islas de patogenicidad.

Tabla 17. Genes localizados en islas de virulencia analizados

SPI	Gen	Función	Referencia	SPI	Gen	Función	Referencia
SPI 1	<i>invE</i>	Invasión de células epiteliales	Ginocchio <i>et al.</i> , 1992	SPI 3	<i>rmbA</i>	Hipotética proteína citoplasmática	NC_003197
SPI 1	<i>invA</i>	Invasión de células epiteliales	Galán <i>et al.</i> , 1992	SPI 3	<i>misL</i>	Colonización intestinal	Dorsey <i>et al.</i> , 2005
SPI 1	<i>orgA</i>	Internalización bacteriana	Jones y Falkow, 1994	SPI 3	<i>mgtC</i>	Transportador de Magnesio	Moncrief y Maguire, 1999
SPI 2	<i>ttrC</i>	Respiración anaerobia	Hensel <i>et al.</i> , 1999	SPI 4	<i>spi4R</i>	Transportador homólogo a <i>lktB</i> *	AF060869
SPI 2	<i>ssaQ</i>	Sistema de secreción	Hensel, 2004	SPI 4	<i>spi4D</i>	Proteína de secreción similar a <i>lipC</i> **	AF060869
SPI 3	<i>sugR</i>	Proteína de unión a ATP	NC_003197	SPI 5	<i>sopB</i>	Respuesta inflamatoria	Norris <i>et al.</i> , 1998
SPI 3	<i>rhuM</i>	Hipotética proteína citoplasmática	NC_003197	SPI 5	<i>pipA</i>	Respuesta inflamatoria	Wood <i>et al.</i> , 1998

**lktB* forma parte del operón *lkt*, relacionado con la producción de leucotoxina

***lipC* forma parte del operón *lip*, implicado en la secreción extracelular de proteínas

En la SPI1 se utilizaron oligonucleótidos para amplificar regiones localizadas en los extremos (Fig. 40; Tabla II.c): una región de 500 pb que incluye parte de los genes *invE* e *invA* y otra correspondiente al gen *orgA*. Todos los aislamientos presentaron amplificaciones positivas.

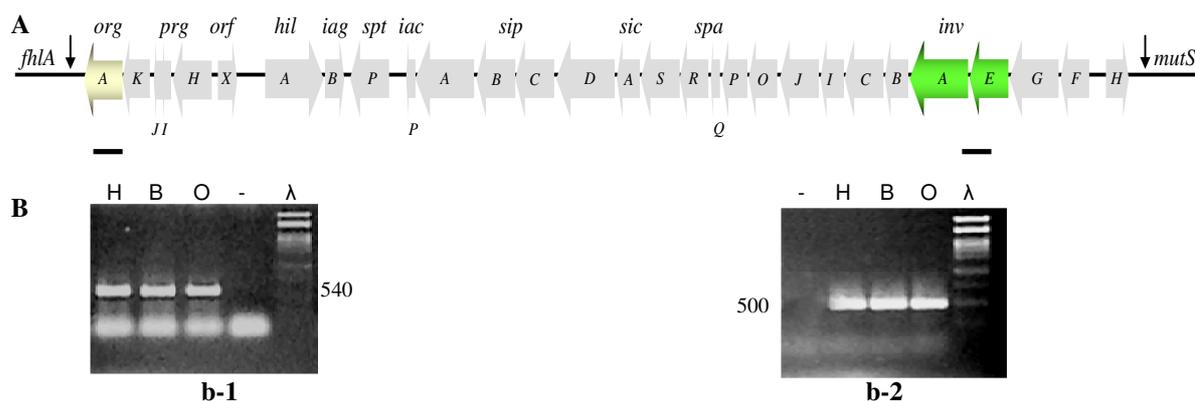


Figura 40. (A) Representación esquemática de SPI1 donde se indican las regiones amplificadas y (B) amplicones (pb) *orgA* (b-1), *invE/A* (b-2). Calle -: control negativo; Calle H: *S. Hadar* LSP481/01; Calle B: *S. Brandenburg* LSP125/02; Calle O: *S. Ohio* LSP191/98; Calle λ: ADN del fago λ digerido con *PstI*

En la SPI2 se emplearon dos pares de oligonucleótidos previamente diseñados para amplificar regiones localizadas en los extremos (Fig. 41; Tabla II.c) correspondientes a los genes *ssaQ* y *ttrC*. En todos los aislamientos ensayados, ambas amplificaciones fueron positivas.

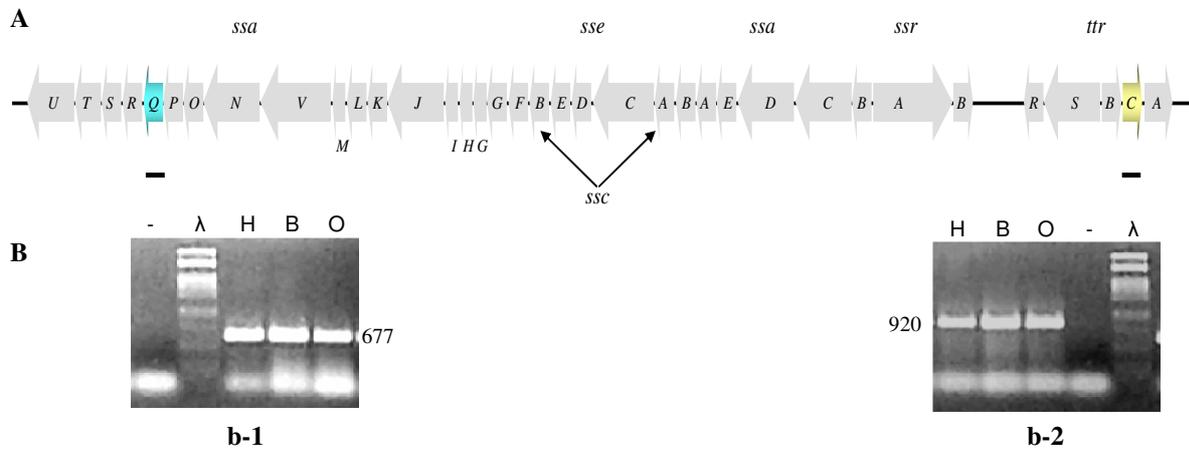


Figura 41. (A) Representación esquemática de SPI2, se indican las regiones amplificadas y (B) amplicones (pb) *ssaQ* (b-1) y *ttrC* (b-2). Calle -: control negativo; Calle H: LSP481/01; Calle B: LSP125/02; Calle O: LSP191/98; Calle λ: ADN del fago λ digerido con *Pst*I

A continuación se ensayó la amplificación de cinco genes de SPI3 (Fig. 42; Tabla II.c): *mgtC* (altamente conservado en diferentes aislamientos de *Salmonella* analizados hasta el momento; Amavisit *et al.*, 2003), *misL*, *sugR*, *rhuM* y *rmbA* (localizados en una zona descrita como inestable). Los resultados obtenidos revelaron diferencias entre los distintos serotipos.

- Todos los aislamientos de *S. Brandenburg* fueron positivos para los cinco genes seleccionados.
- Todos los aislamientos de *S. Hadar* resultaron positivos para los genes *mgtC*, *misL* y *rmbA* y negativos para *sugR* y *rhuM*.
- Todos los aislamientos de *S. Ohio* generaron amplicones de tamaño adecuado para los genes *rhuM*, *rmbA*, *misL* y *mgtC*. Sin embargo, en el caso de *sugR* el fragmento obtenido (337 pb) presentó un tamaño inferior al esperado (850 pb). Para investigar la posible existencia de una delección en el gen *sugR* de *S. Ohio*, se determinó la secuencia de nucleótidos de cuatro amplicones *sugR*: dos de este serotipo y dos de *S. Brandenburg*. La comparación de las secuencias obtenidas con las depositadas en la base de datos (Fig. 43) puso de manifiesto los siguientes resultados:

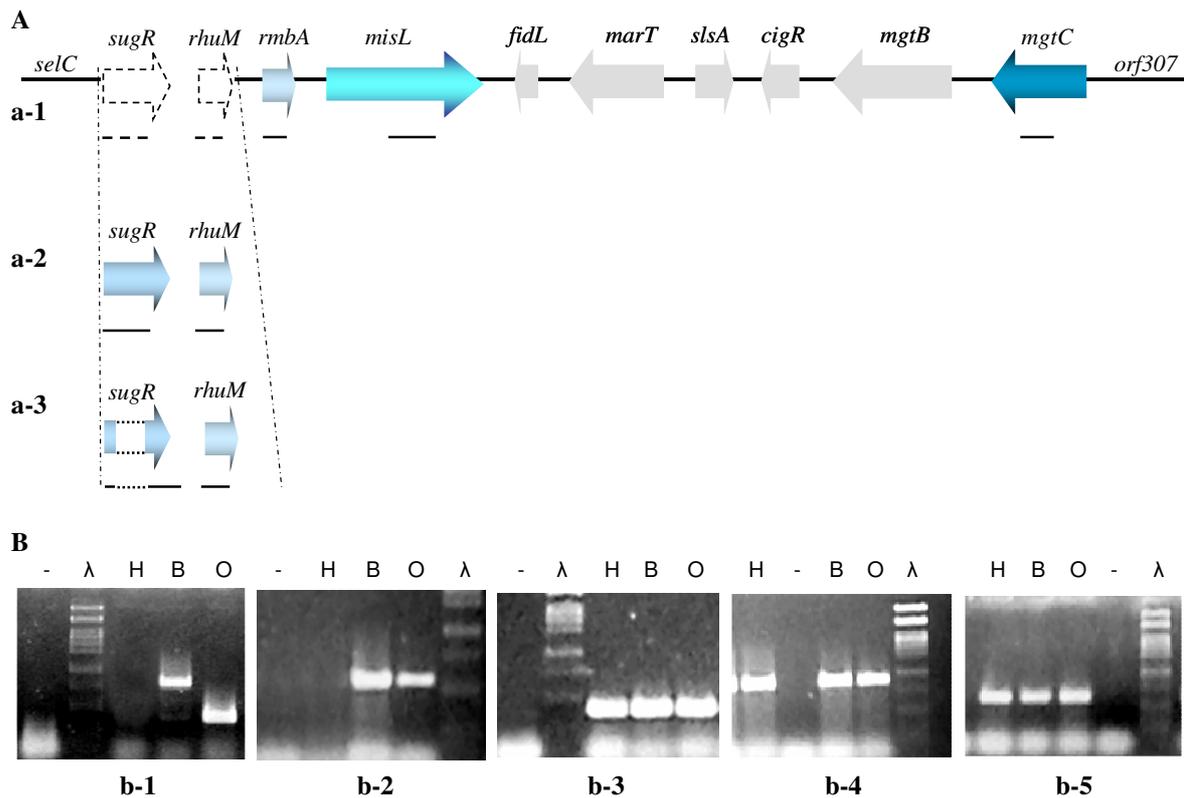


Figura 42. (A) Representación esquemática de los genes de SPI3 amplificados en *S. Hadar* (a-1), *S. Brandenburg* (a-2) y *S. Ohio* (a-3). Las líneas discontinuas representan genes o secuencias no encontradas. (B) Amplicones *sugR* (b-1), *rhuM* (b-2), *rmbA* (b-3), *misL* (b-4), *mgtC* (b-5). Calle -: control negativo; Calle H: LSP481/01; Calle B: LSP125/02; Calle O: LSP191/98; Calle λ: ADN del fago λ digerido con *Pst*I

- Los dos amplicones de *S. Brandenburg* (850 bp) fueron idénticos entre si y también con la región correspondiente del gen *sugR* de *S. Typhimurium* ATCC14028, depositado en bases de datos.
- Los extremos 5' y 3' de las secuencias de *S. Ohio* presentaron una homología del 96% y del 99% con los extremos 5' y 3', respectivamente, del gen *sugR* de los demás serotipos (posiciones 361-521 y 1038-1147 en el gen *sugR* de *S. Typhimurium*).
- El amplicón *sugR* de *S. Ohio* contiene una deleción interna que afecta a 515 pb correspondientes a los nucleótidos 522-1036 del gen de *S. Typhimurium*. Tanto en este último como en los amplicones *sugR* de *S. Brandenburg*, la región delecionada en *S. Ohio* se encuentra flanqueada por repeticiones directas imperfectas (cagcgccttttc/cagcgc-atttc; Fig. 43). Estas repeticiones podrían haber sido responsables de la deleción ocurrida en el gen de *S. Ohio*, donde sólo se observa la secuencia cagcgcatttc (ver Discusión).

361
 gcggcgcagcttaccggttgggtgaacaacttcagacgctggtgcgtgaagagcataatttgcagcaggttgactt
 gcggcgcagcttaccggttgggtgaacaacttcagacgctggtgcgtgaagagcatagtttgcagcaggttgactt
 cccttatctggggactgctccttctgggtatcactaatgctggaacgttatgaggcacagcctactgaacagcgtctg
 cccttatctggggactgctcacttatgggtatcactaatgctggaacgttatgaggcacagcctactgaacaacgtctg
 gataa **cagcgccttttc**acgtttgtctgggtatgacgattgcctttctgccacatcaaattataagcaatttgaacaa
 gataa **cagcg**-----
 tggatatagctggttatggcttagctaccgtgaacatcaaatacacacaacttgaatcaccttcagcaaagttaaaagaa

 ggtgttcgtgttcagcggatgaaagaagctattcaagccatccagcaagccattaactgtctgacgcaggaagtgact

 ggctggcacgatctggaatacagctccagccataaccagcaattggtgatgaaccatccacagcacggttaagattccc

 ttatcccagctcagcgacggcctgcgtaatgcggttgcgatggttagcggatatacgcgtttcgtctgtgcaactcaac

 cccatttacgcgatgaagccgcttaaaaaacacaggggattgtgctgatcgatgaagtcgatatgttcctgcacca

 gcctggcagcagcaaattatccagtcctttgcgcagcgcctatccagtcctttgcg **cagcgcatttc**cactaatccagttt
 ----- **catttc**cactaatccagttt
 atgtcactacccatagcccgcaggttatcagcacggtaaaacgtgagtcgttctgcctacttgaacaggacgagaaa
 atgtcactacccatagcccgcaggttatcagcacggtaaaacgtgagtcgttctgcctacttgaacaggacgagaaa
 ggtaatg ¹¹⁴⁷
 ggtaatg

Figura 43. Comparación de la secuencia de nucleótidos (5'→3') del amplicón *sugR* de *S. Ohio* LSP191/98 (azul) con la secuencia del gen *sugR* de *S. Typhimurium* (AF106566). Las diferencias entre ellas aparecen resaltadas en azul claro. Las repeticiones directas imperfectas, presentes en el gen de *S. Typhimurium*, y la secuencia relacionada del gen *sugR* de *S. Ohio* se muestran en negrilla y destacadas en gris

En el caso de SPI4 se emplearon oligonucleótidos específicos para los genes *spi4R* y *spi4D*, resultando positivos los aislamientos de los tres serotipos (Fig. 44; Tabla II.c).

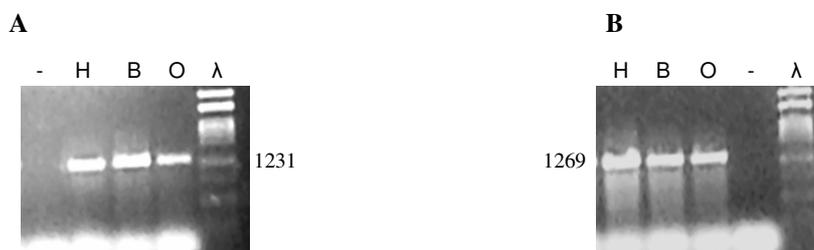


Figura 44. Amplicones (pb) *spi4D* (A) y *spi4R* (B). Calle -: control negativo; Calle H: LSP481/01; Calle B: LSP125/02; Calle O: LSP191/98; Calle λ: ADN del fago λ digerido con *Pst*I

Finalmente, se analizó la presencia de dos genes pertenecientes a SPI5 (Fig. 45; Tabla II.c), uno de ellos (*sopB*) descrito como conservado y el otro (*pipA*) como variable (Hensel., 2004).

- Todos los aislamientos de los serotipos Hadar y Ohio resultaron positivos para ambos genes.
- En el caso de *S. Brandenburg* se consiguió amplificar el gen *sopB* pero no el gen *pipA*. Esto sugiere la existencia de una delección en SPI5 de este serotipo.

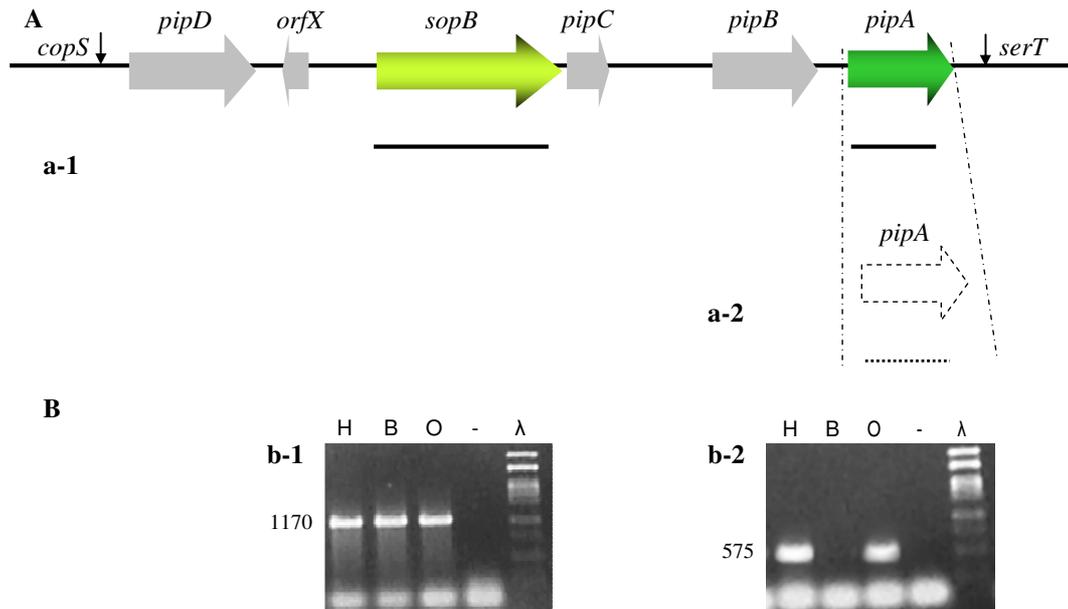


Figura 45. (A) Representación de los genes de SPI5 amplificados en *S. Hadar*, *S. Ohio* (a-1) y *S. Brandenburg* (a-2). (B) Amplicones (pb) *sopB* (b-1) y *pipA* (b-2) Calle -: control negativo; Calle H: LSP481/01; Calle B: LSP125/02; Calle O: LSP191/98; Calle M: ADN del fago λ digerido con *Pst*I

IV.2. GENES NO ASOCIADOS A ISLAS DE PATOGENICIDAD

IV.2.a. Plásmido de virulencia

Se rastreó la presencia de distintos genes localizados en plásmidos de virulencia específicos de determinados serotipos de *S. enterica* (ver Introducción): *spvC* (relacionado con invasividad), *rck* (implicado en resistencia al suero) y *pefA*, *pefB*, *pefC* y *pefD* (del operón *pef* que codifica fimbrias que intervienen en el proceso de adherencia). De acuerdo con lo esperado, ninguno de estos genes pudo ser detectado en los aislamientos de *S. Hadar*, *S. Brandenburg* y *S. Ohio*.

IV.2.b. Islotes de virulencia y genes sueltos

Existe una gran variedad de genes con un papel más o menos destacado en la patogenicidad de *S. enterica* que no se encuentran ni en SPIs ni en el plásmido de virulencia, sino agrupados formando pequeños islotes o aislados en el cromosoma bacteriano. En el presente trabajo se investigó la presencia de algunos de estos genes (Fig. 46; Tabla II.c).

- Gen *phoP/Q*, regulador transcripcional de genes de virulencia (Miller, 1991). Todos los aislamientos de los serotipos Hadar, Brandenburg y Ohio fueron positivos para este gen.
- Genes que codifican toxinas: *stn* (enterotoxina; Prager *et al.*, 1995) y *ast* (toxina East1; Savarino *et al.*, 1993). El primero se detectó en todos los aislamientos de los serotipos en estudio, mientras que el segundo no se encontró en ninguno.
- Gen *hin/H2*, implicado en la variación de fase flagelar (ver Introducción; Way *et al.*, 1993). Todos los aislamientos analizados resultaron positivos.
- Gen *iroB*, relacionado con la captación de hierro (Bäumler *et al.*, 1996a). En todos los aislamientos de los serotipos Hadar, Brandenburg y Ohio se detectó este gen.

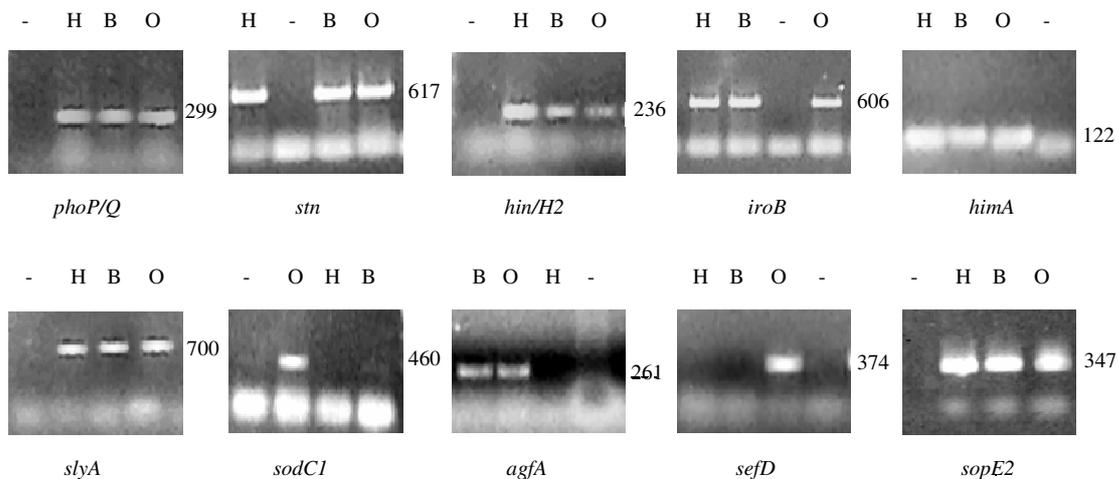


Figura 46. Amplificación de los genes de virulencia indicados. Calle -: control negativo; Calle H: LSP481/01; Calle B: LSP125/02; Calle O: LSP191/98. Los números a la derecha de los geles indican el tamaño (en pb) de los distintos amplicones

- Gen *himA* (Gottesman y Abremski, 1980), implicado en procesos de replicación, recombinación y regulación cromosómica, afecta directa o indirectamente a la transcripción de diferentes genes entre ellos el regulador (*spvR*) del operón *spv* del

plásmido de virulencia en *S. Typhimurium* (Marshall *et al.*, 1999). Presente también en todos los aislamientos.

- Gen *slyA* regulador transcripcional de genes de virulencia necesarios para la supervivencia en macrófagos (Libby *et al.*, 1994). También se encontró en todos los aislamientos.
- Gen *sodC1*, implicado en la resistencia al estrés oxidativo (Bannister *et al.*, 1987). En ninguno de los aislamientos de los serotipos Hadar y Brandenburg se detectó este gen, mientras todos los de *S. Ohio* resultaron positivos.
- Genes relacionados con fimbrias, *agfA* (Doran *et al.*, 1993) y *sefD* (Clouthier *et al.*, 1994). En ningún aislamiento de *S. Hadar* se consiguió la amplificación de estos genes. Sin embargo, tanto los aislamientos de *S. Brandenburg* como los de *S. Ohio* fueron positivos para *agfA*, mientras que *sefD* fue detectado en los segundos pero no en los primeros.
- Genes *sopE2* y *sopE*, que codifican proteínas efectoras secretadas por SPI1-SST3 (Hardt *et al.*, 1998). Todos los aislamientos de *S. Hadar*, *S. Brandenburg* y *S. Ohio* presentaron el gen *sopE2*. Por el contrario, *sopE* sólo se detectó en 76 aislamientos de *S. Hadar* y en dos de *S. Brandenburg*.

IV.3. ASIGNACIÓN DE CEPAS A PERFILES DE VIRULENCIA

En total se identificaron cinco perfiles de virulencia (V1 y V2 en *S. Hadar*, V3 y V4 en *S. Brandenburg* y V5 en *S. Ohio*), encontrándose mayores variaciones inter-que intra-serotipo. La mayoría de éstas ocurrieron en las regiones menos conservadas de las SPIs 3 y 5 o afectaron a la presencia o ausencia de cuatro genes: dos de ellos implicados en la producción de fimbrias, uno de codificación fágica y otro relacionado con resistencia al estrés oxidativo (Tabla 18).

- Los aislamientos de *S. Hadar* se caracterizan por la ausencia de los genes *agfA*, *sugR* y *rhuM*, presentes sin embargo en *S. Brandenburg* y *S. Ohio* (aunque *sugR* contiene una deleción en este último; apartado IV.1; Fig. 43). 76 aislamientos (90,5%) fueron positivos para *sopE* (perfil V1) y el resto negativos (perfil V2).
- Todos los aislamientos de *S. Brandenburg* mostraron genes *sugR* y *rhuM* aparentemente intactos, aunque se dividieron en dos perfiles en base a la presencia o ausencia de *sopE*. La mayoría (94,6%) no contienen este gen (perfil V3), que sólo se detectó en dos aislamientos (perfil V4).
- Los aislamientos de *S. Ohio* se caracterizaron por presentar los genes *sodC1*, *sefD* y un gen *sugR* delecionado y por carecer del gen *sopE* (perfil V5).

Tabla 18. Perfiles de virulencia de los serotipos estudiados

Serotipo (N)	Perfil (N)	Genes SPI/
		Genes sueltos *
Hadar (84)	V1 (76)	<i>orgA;invE/A;ttrC;ssaQ;rmbA;misL;mgtC;spi4D;spi4R;sopB;pipA/iroB;phoP/Q;hin/H2;himA;slyA;stn;sopE2;sopE</i>
	V2 (8)	<i>orgA;invE/A;ttrC;ssaQ;rmbA;misL;mgtC;spi4D;spi4R;sopB;pipA/iroB;phoP/Q;hin/H2;himA;slyA;stn;sopE2</i>
Brandenburg (37)	V3 (35)	<i>orgA;invE/A;ttrC;ssaQ;sugR;rhuM;rmbA;misL;mgtC;spi4D;spi4R;sopB/iroB;phoP/Q;hin/H2;himA;agfA;slyA;stn;sopE2</i>
	V4 (2)	<i>orgA;invE/A;ttrC;ssaQ;sugR;rhuM;rmbA;misL;mgtC;spi4D;spi4R;sopB/iroB;phoP/Q;hin/H2;himA;agfA;slyA;stn;sopE2;sopE</i>
Ohio (55)	V5 (55)	<i>orgA;invE/A;ttrC;ssaQ;ΔsugR;rhuM;rmbA;misL;mgtC;spi4D;spi4R;sopB;pipA/iroB;phoP/Q;hin/H2;himA;agfA;slyA;stn;sopE2;sodC1;sefD</i>

N, número de aislamientos

*, los genes diferenciales se muestran en negrilla

Parte de los resultados de este capítulo se encuentran recogidos en el artículo:

- Rodríguez, M., I. de Diego, N. Martínez, M. R. Rodicio y M. C. Mendoza. 2006. Nontyphoidal *Salmonella* causing focal infections in patients admitted at a Spanish general hospital during an 11-year period (1991-2001). *Int. J. Med. Microbiol.* **296**: 211-22.

Y en la comunicación:

- Rodríguez, M., N. Martínez, I. de Diego, F. Pérez y M. C. Mendoza. 2003. Salmonelosis extraintestinal geriátrica en el HCA. Factores microbiológicos y cuadros clínicos. X Reunión de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Oviedo.

Los datos sobre virulencia obtenidos en este apartado se incluirán en un trabajo más amplio que englobará diferentes serotipos, tanto prevalentes como no prevalentes, de *S. enterica*:

- Detection of virulence genes in different serovars of *Salmonella enterica*.

Discusión

Ante los objetivos planteados y los resultados obtenidos se pueden responder diferentes preguntas sobre cada uno de ellos y comparar la información resultante con la reflejada en la literatura científica. Para la discusión de estos datos se seguirá el mismo orden que en la sección Resultados.

1. IMPACTO EPIDEMIOLÓGICO

Los tres serotipos de *Salmonella* sujetos a estudio en esta tesis (Hadar, Brandenburg y Ohio) estuvieron representados por aislamientos registrados en el Principado de Asturias durante el periodo 1991-2005: 84, 37 y 55, respectivamente. Estos valores los sitúan a una distancia considerable de los dos serotipos mayoritarios: Enteritidis y Typhimurium, con 4478 y 1231 aislamientos en el mismo periodo. Además, se constató un descenso notable de los tres serotipos a partir de 2002 (Fig. 47A), aunque en el caso de *S. Ohio* ocurrió un rebrote en el año 2003, con 14 aislamientos (presumiblemente implicados en un brote comunitario a nivel regional) frente a los tres y uno de los años anterior y posterior.

De acuerdo con lo esperado, la mayoría de los aislamientos procedieron de las áreas sanitarias IV (Oviedo) y V (Gijón), que cuentan con mayor número de habitantes. Durante el periodo 1995-2004 (contemplado en la Figura 47A, ya que la serie de *S. Hadar* se inicia en 1995), la incidencia de los tres serotipos por 10⁵ habitantes fue de 1,51 aislamientos/año. En los casos de *S. Hadar* y *S. Ohio* no se observaron diferencias importantes en cuanto al sexo (Fig. 47B), mientras que en *S. Brandenburg* la incidencia fue superior en mujeres que en hombres (62,5 frente a 37,5%) aunque estadísticamente esta diferencia no resultó significativa ($p > 0,15$). Por otro lado (Fig. 47C), *S. Ohio* y *S. Brandenburg* afectaron principalmente a niños menores de 2 años (45,2% y 32%, respectivamente) y *S. Hadar* a personas entre 14 y 60 años (38,6%) que constituyen el grupo etario de mayor población. Finalmente, en cuanto a la estacionalidad de los episodios (Fig. 47D), el 56,5% ocurrió en el período cálido (mayo a octubre) frente al 43,5% del período frío (noviembre-abril). Nuevamente esta diferencia no es significativa ($p > 0,1$).

En relación a la presentación clínica, 167 aislamientos se recuperaron de heces. De éstos, 157 originaron episodios esporádicos de enteritis aguda y los diez restantes estuvieron implicados en cuatro episodios que cursaron con diarrea recurrente fueron causados por *S. Brandenburg* (uno en 1993) y *S. Ohio* (tres en 1991, 1995 y 1998), siempre en niños menores de dos años. Cinco aislamientos de los serotipos *S. Hadar* (3) y *S. Brandenburg* (2) originaron infecciones focales. Tres de ellos, procedentes de orina (dos de *S. Hadar*, uno de *S. Brandenburg*), causaron infecciones urinarias. Otros dos (uno de cada serotipo) se recuperaron de abscesos y uno derivó posteriormente en enteritis aguda, aislándose *S. Hadar* de las heces del paciente dos meses más tarde. Estudios

previos relacionan ambos serotipos con infecciones extraintestinales aunque con una baja incidencia (Rodríguez *et al.*, 1998, 2006d; Björkman *et al.*, 2002; Caers *et al.*, 2006). Los cuatro aislamientos restantes no procedían de muestras clínicas, dos de ellos (*S. Brandenburg*) se obtuvieron de alimentos (derivados cárnicos) y los otros dos (*S. Brandenburg* y *S. Ohio*) de muestras ambientales (aguas residuales).

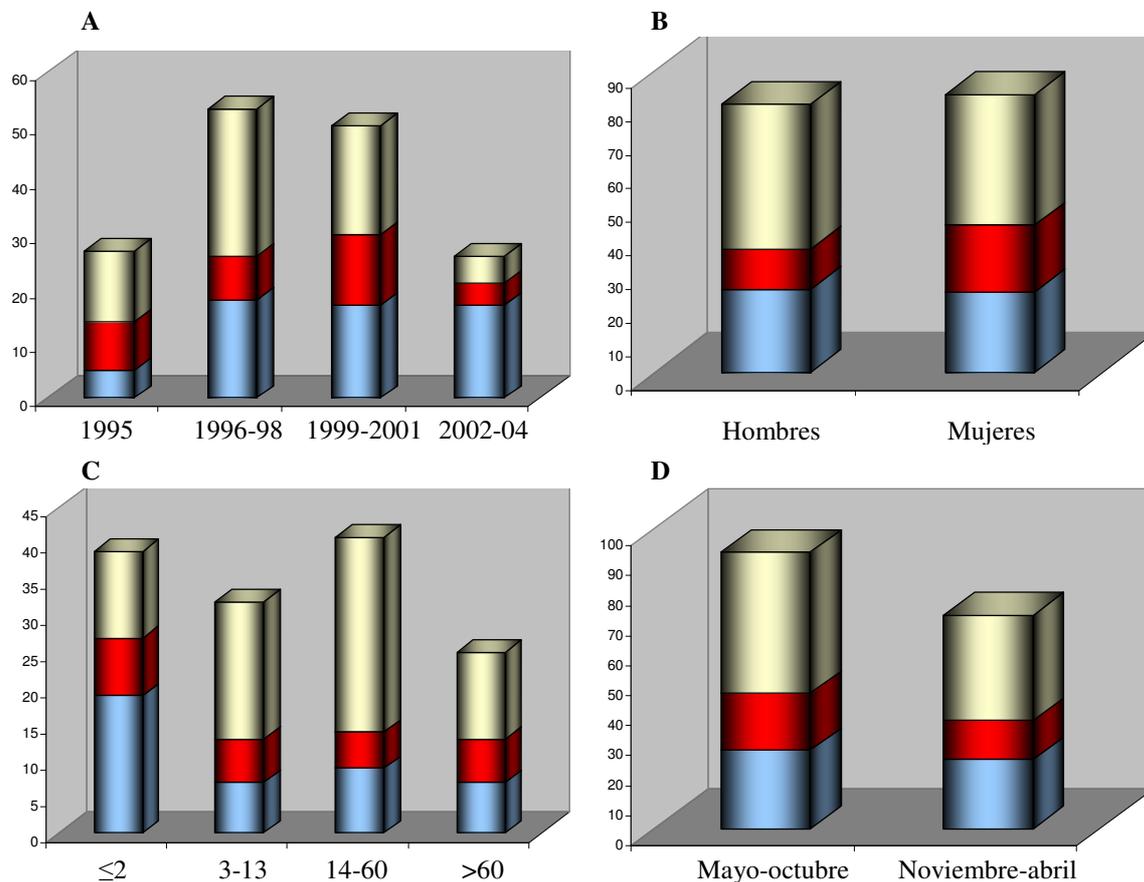


Figura 47. Distribución epidemiológica de los aislamientos de *S. Hadar*, *S. Brandenburg* y *S. Ohio* recuperados en el Principado de Asturias durante el período 1995-2004. (A) Años; (B) Sexo; (C) Edad; (D) Estacionalidad

En España, la frecuencia registrada por el LNRSSSE para estos tres serotipos, sitúa a *S. Hadar* en tercera posición, a partir de 1996, con un número muy inferior de aislamientos que los recogidos para *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*, que ocupan los dos primeros puestos. A partir del año 2000 se observa una disminución en *S. Hadar* aunque conserva la tercera posición (Echeita *et al.*, 2005a, b). Por su parte, *S. Ohio* se sitúa alrededor del séptimo puesto en el periodo 1997-2003 (1,3% en 2003) y *S. Brandenburg*, se mueve en torno a la décima posición (0,3% en el mismo año) (ver Introducción).

Aproximadamente el 90% de los aislamientos de *Salmonella spp.* recuperados a nivel nacional, procedían de heces, el 3% de muestras de sangre, el 1% de muestras de orina y porcentajes inferiores al 1% de otros orígenes. Estos datos son similares a los comentados para nuestra serie, aunque ninguno de los 172 aislamientos clínicos analizados estuvo implicado en bacteriemia. Por otro lado, el mayor número de aislamientos de *Salmonella* procedió, en España, de niños menores de cinco años, grupo etario en el que también se registraron la mayoría de episodios ocasionados por *S. Ohio* y *S. Brandenburg* en el Principado de Asturias. No se registraron diferencias estadísticamente significativas en la incidencia de *Salmonella* en función del sexo del paciente (Usera *et al.*, 2001a, 2003a; Echeita *et al.*, 2005a, b; B.E.S. 2004 y 2005), pero si en cuanto a la distribución estacional, con un mayor número de casos en verano y al inicio de la primavera.

Durante el periodo de estudio se detectaron en el Principado de Asturias diferentes brotes de salmonelosis, tanto familiares como comunitarios, causados por los serotipos analizados en este trabajo. Primeramente, en el año 1995 en el área sanitaria V se registraron dos brotes familiares, uno de los cuales fue originado por *S. Hadar*, con dos afectados, de los que no consta la edad, con un cuadro clínico de enteritis aguda. El segundo brote, atribuido a *S. Ohio*, involucró a dos niños de un año y un mes, respectivamente. En este caso se registraron tres aislamientos, ya que el menor de los niños presentó un cuadro de diarrea recurrente, aislándose *Salmonella* en dos muestras de heces del paciente con un intervalo de tres meses. Además, los resultados obtenidos en el presente trabajo revelaron un brote adicional, causado por *S. Brandenburg* en el año 2000 (ver apartado 2) que, sin embargo, no fue declarado oficialmente. El brote afectó a nueve personas del área sanitaria V, durante los meses de septiembre y octubre (nueve aislamientos). De la misma manera, durante el mes de enero de 2003 se registró un número inusualmente alto de aislamientos adscritos al serotipo Ohio (14), cuya caracterización (apartado 2) apoyó la existencia de otro brote a nivel regional, con aislamientos adscritos a las áreas sanitarias II, IV, V y VI, que en conjunto atiende a una población de más de 700.000 habitantes. Los alimentos responsables de estos brotes no se conocen.

A nivel nacional, durante el periodo 2000-2005, *S. Hadar* se vio implicada en cuatro brotes comunitarios y cinco familiares; *S. Brandenburg* en dos brotes familiares y *S. Ohio* en dos brotes comunitarios y uno familiar (Usera *et al.*, 2001b, 2003b; Echeita *et al.*, 2005c). En la mayoría de los brotes alimentarios el alimento implicado resultó ser el huevo crudo o poco cocinado, seguido a distancia de carne de ave, vacuna y porcina, pescados y mariscos y productos de pastelería. Es interesante destacar el brote alimentario originado por la ingesta de pollo pre-cocinado, que tuvo lugar en 2005 (Lenglet, 2005). Se trató de un brote comunitario de incidencia nacional que afectó a 17 comunidades autónomas y registró 2138 casos de gastroenteritis por *Salmonella* entre el 21 de

julio y el 8 de agosto de 2005, produciéndose 234 hospitalizaciones y el fallecimiento de un hombre de 90 años. En el LSP del Principado de Asturias se recogieron 15 aislamientos de pacientes asociados a este brote, que no fueron incluidos en el presente trabajo, ya que la serie de *S. Hadar* terminó en 2004. Las características fenotípicas y genotípicas indicaban que se trataba de una cepa resistente ampicilina, estreptomicina, tetraciclina y ácido nalidíxico, y con perfil-PFGE similar al X1, igual que el 71% de los aislamientos del Principado de Asturias, del periodo 1999-2004 (M. Bances, comunicación personal).

En cuanto al reservorio de los serotipos incluidos en el estudio, los Laboratorios de Sanidad Animal españoles y el LNRSSSE aislaron *S. Hadar* principalmente de aves de corral (96,7%) hasta el año 2001. En el periodo 2002-2004, sin embargo, la mayoría de los aislamientos se obtuvieron de ganado porcino (82,8%), registrándose únicamente 5 precedentes de aves. En este mismo periodo, la mayoría de los aislamientos adscritos a *S. Ohio* se obtuvieron de aves (85,1%), mientras que *S. Brandenburg* se encuentra claramente asociado a ganado porcino, procediendo de cerdos el 79,6% de los aislamientos de 2000-2004 (García *et al.*, 2001; Usera *et al.*, 2001c; Valdezate *et al.*, 2003; de Frutos *et al.*, 2005a, b).

2. ASIGNACIÓN DE AISLAMIENTOS A TIPOS GENÓMICOS

En estudios epidemiológicos es importante asociar un caso con otro, con el vehículo de transmisión y con reservorios, para ello se ha de acudir a métodos de tipificación. Estos métodos se basan en la premisa de que organismos clonalmente relacionados comparten características que permiten diferenciarlos de organismos no relacionados. El que una característica sea de elección en la tipificación está en relación con su estabilidad en una determinada cepa y su diversidad entre las cepas que forman una especie. Los métodos clásicos de tipificación de *Salmonella* incluyen la determinación del serotipo, biotipo y fagotipo, que constituyen el primer nivel para la caracterización de una cepa. Sin embargo, en los últimos años, el desarrollo de la genética molecular ha llevado al diseño de técnicas que analizan directamente el ADN plasmídico y cromosómico. Las técnicas que analizan el ADN cromosómico estudian una molécula estable que permite diferenciar tipos genómicos, así como determinar los tipos más y menos frecuentes que constituyen una determinada especie (Struelens, 1996).

La tipificación genotípica de los aislamientos de *S. Hadar*, *S. Brandenburg* y *S. Ohio* se llevó a cabo mediante dos técnicas que analizan el genoma completo de las bacterias: RAPD y macrorrestricción-PFGE.

La tipificación RAPD se basa en la amplificación de secuencias multicopia aleatorias que forman parte de regiones del ADN con función desconocida. Se valoraron dos variantes de esta

técnica usando los iniciadores S y C. El iniciador S fue descrito como válido para especies procariotas y eucariotas por Williams *et al.*, en 1990. Posteriormente ha sido utilizado en nuestro laboratorio para diferenciar cepas de distintos serotipos de *Salmonella* (Martín *et al.*, 1997; Rodríguez *et al.*, 1998, Soto *et al.*, 1999, 2000, 2001; del Cerro *et al.*, 2002; Martínez *et al.*, 2005), al igual que el iniciador C (Landeras y Mendoza, 1998; Rodríguez *et al.*, 1998; Soto *et al.*, 1999, 2000, 2001; del Cerro *et al.*, 2002; Martínez *et al.*, 2005). Este último fue descrito por Lin *et al.* (1996) y designado OPB-17 por estos autores.

Con el iniciador S no se consiguió una buena diferenciación intra-serotipo, ya que dentro de cada uno sólo se distinguieron dos perfiles estrechamente relacionados, siendo uno de ellos claramente mayoritario. Sin embargo, si se obtuvieron perfiles inter-serotipo distintos. El iniciador C también consiguió una buena diferenciación inter-serotipo, mientras que la diferenciación intra-serotipo fue variable. Todos los aislamientos de *S. Ohio* compartieron el mismo perfil C; 82 aislamientos de *S. Hadar* presentaron el mismo perfil y sólo los dos restantes fueron distintos. Por el contrario, en *S. Brandenburg* este iniciador permitió la diferenciación de los 37 aislamientos en 11 perfiles.

Para el análisis de macrorrestricción-PFGE, considerado actualmente como el mejor método de tipificación tanto para *Salmonella* (Peters *et al.*, 2003) como para otras bacterias patógenas (Singh *et al.*, 2006), se valoraron las endonucleasas *XbaI* y *BlnI*, de baja frecuencia de corte. La digestión con *XbaI* permitió una buena diferenciación inter-serotipo, obteniéndose perfiles claramente distintos para los tres serotipos en estudio y también para *S. Braenderup* H9812 (control fuera de grupo). Sin embargo, dentro de cada uno de ellos, la capacidad de diferenciación varió considerablemente. Así, *S. Hadar* sólo presentó tres perfiles *XbaI*, uno de ellos claramente predominante, que diferían entre sí en un máximo de dos fragmentos. Por ello, todos los aislamientos se englobaron en un único grupo ($S \geq 0,77$; dendrograma no mostrado). En el serotipo *Ohio* la diferenciación obtenida fue considerablemente superior, generándose 11 perfiles que se distribuyeron en dos grupos y dos ramas independientes (S entre 0,88 y 0,38). De manera similar, los 37 aislamientos de *S. Brandenburg* dieron lugar a 12 perfiles que a su vez formaron tres grupos y dos ramas (S entre 0,90 y 0,30).

Por su parte, *BlnI* permitió una buena diferenciación tanto inter-serotipo como intra-serotipo. En el caso de *S. Hadar*, esta endonucleasa distinguió un total de siete perfiles que se distribuyeron en dos grupos y dos ramas (S entre 0,90 y 0,49). El mayor poder de discriminación de *BlnI* con respecto a *XbaI*, para la tipificación de aislamientos de *S. Hadar*, ya había sido observado por Weide-Botjes *et al.* (1998). En el serotipo *Brandenburg* con *BlnI*, al igual que con *XbaI*, se obtiene un alto número de perfiles (14), distribuidos en tres grupos y cinco ramas (S entre 0,90 y

0,20). Por el contrario, la digestión con *BlnI* de aislamientos del serotipo Ohio generó únicamente seis perfiles, cinco menos que el enzima anterior, que se encuadraron en un grupo y dos ramas sueltas (S entre 0,86 y 0,63).

Pese a que, en algunos casos, *BlnI* dio mejores resultados que *XbaI*, esta última endonucleasa ha sido seleccionada para el protocolo normalizado de vigilancia epidemiológica de *Salmonella*. Por tanto, la utilización de *XbaI* hace posible comparar los datos obtenidos en diferentes laboratorios permitiendo un buen seguimiento epidemiológico de los clones de *Salmonella* circulantes y la detección de brotes a nivel regional, nacional y/o mundial (Peters *et al.*, 2003). El elevado coste de *BlnI* con respecto a *XbaI*, supone un inconveniente adicional para su utilización rutinaria.

Cabe señalar, finalmente, que aunque la técnica RAPD es más rápida y económica, presentó baja diferenciación intra-serotipo y problemas de reproducibilidad. Por el contrario, la macrorrestricción con *XbaI* y/o *BlnI* resultó altamente reproducible, los perfiles obtenidos fueron fácilmente interpretables y permitió una buena diferenciación inter- e intra-serotipo.

Tras comparar los resultados obtenidos mediante tipificación RAPD y PFGE nos decantamos por esta última metodología a la hora de establecer los clones presentes en nuestra región, analizando, además, la posible correlación con datos epidemiológicos y con perfiles de resistencia y virulencia.

En el serotipo Hadar encontramos un tipo genómico mayoritario, designado TG-H1, que puede considerarse endémico, ya que incluye 24 aislamientos, la mayoría implicados en casos de gastroenteritis aguda, distribuidos a lo largo de todo el periodo de estudio (1995-2004). Estos aislamientos comparten los perfiles X1, R11 y V1. Muy similar sería el tipo TG-H5, con ocho aislamientos de 1997-2001, que sólo se diferencian de los anteriores por presentar el perfil minoritario V2. Con 12 aislamientos cada uno aparecen los tipos TG-H2 y TG-H3, ambos R8 y V1, pero con perfiles de macrorrestricción diferentes (X1 y X2, respectivamente). El siguiente en frecuencia fue TG-H4, también endémico, con diez aislamientos, de 1995 a 2004, sensibles a todos los antimicrobianos ensayados (perfil R0), que fueron además V1 y X1. El resto de tipos de *S. Hadar* incluyeron un máximo de dos aislamientos, considerándose por tanto esporádicos. Entre las salmonelosis originadas por este serotipo se informó un brote familiar con dos personas implicadas, en el que la cepa responsable se pudo adscribir a TG-H2. También se informó de tres pacientes con infecciones extraintestinales, una de ellas (infección de orina), causada por una cepa TG-H3 y otra por una cepa TG-H5 (correspondiente a un absceso). Esta última derivó, dos meses más tarde, en una gastroenteritis, recuperándose de heces la misma cepa. Por último, una mujer de 29 años presentó gastroenteritis e infección de orina, aislándose dos cepas de *S. Hadar* ligeramente

diferentes. A partir de la muestra de orina se recuperó una cepa TG-H1 mientras que la cepa obtenida de la muestra de heces se distinguía de la anterior por presentar una resistencia adicional a gentamicina (perfil R12). Los aislamientos diferían, además, en el perfil de plásmidos. Mientras el procedente de orina sólo contenía el plásmido de 9 Kb portador del gen *bla*_{TEM} de resistencia a ampicilina, el obtenido de heces portaba este mismo plásmido junto con otro de 95 Kb en el que se localizó el gen *aac(3)IV* de resistencia a gentamicina. Esto nos lleva a pensar que en un principio se trató de la misma cepa TG-H1 de *S. Hadar* que, a su paso por el tracto gastrointestinal de la mujer, incorporó un segundo plásmido de resistencia. Estamos, aparentemente, ante un ejemplo de evolución en tiempo real, apoyado al encontrarse el plásmido de 95 Kb únicamente en este aislamiento.

En el serotipo Ohio se encontró un tipo genético claramente endémico: TG-O1, que abarca el período 1992-2005, con 23 aislamientos, la mayoría implicados en casos aislados de gastroenteritis aguda, que comparten los perfiles R0, V5 y X1B2. Ocho aislamientos de este tipo se recogieron durante el mes de enero de 2003 en diferentes áreas sanitarias del Principado de Asturias. El incremento de aislamientos de *S. Ohio* durante este mes, nos hizo sospechar la existencia de un brote no declarado oficialmente, que puede ser atribuido al tipo TG-O1. Otros tres aislamientos, recuperados en la misma época, sólo se distinguieron de los anteriores por presentar el perfil X11 (tipo TG-O2), que se diferencia de X1 en dos bandas ($S = 0,77$). De acuerdo con los criterios establecidos por Tenover *et al.* (1995) estos aislamientos están estrechamente relacionados, pudiendo pertenecer al mismo brote. TG-O1 se vio implicado, además, en un caso de diarrea recurrente, que afectó a una niña menor de un año, obteniéndose aislamientos con idénticas características en dos meses sucesivos. El tipo TG-O3 (R0, V5, X1B1), se encontró en cuatro aislamientos recogidos en meses sucesivos a partir de muestras de heces de un niño menor de un año, tratándose, como era esperable, de una única cepa. Por otro lado, el tipo TG-O4 (R2, V5, X1B2) fue responsable de un brote familiar de salmonelosis que involucró a dos niños menores de un año. El más pequeño sufrió una diarrea recurrente, obteniéndose la misma cepa en todos los casos. El resto de tipos genómicos aparecieron en un máximo de dos aislamientos y, al igual que TG-O2, TG-O3 y TG-O4, pueden considerarse esporádicos.

En el serotipo Brandenburg, de acuerdo con la alta diversidad encontrada, no se detectó ningún tipo genómico prevalente. Los más frecuentes fueron TG-B1 (R0, V3, X9B7), TG-B2 (R0, V3, X9B10) y TG-B3 (R0, V3, X3B3), con cinco, cuatro y tres aislamientos respectivamente. El resto incluyó un único representante. En este serotipo se registró un único caso de diarrea recurrente, que afectó a un niño menor de dos años. A partir de muestras de heces se recuperaron, en meses consecutivos, dos cepas que se diferenciaban únicamente en el perfil-R. La primera,

recogida en noviembre de 1993, fue resistente a kanamicina y estreptomicina, mientras la aislada en diciembre del mismo año, resultó además resistente a cloranfenicol. Podríamos estar ante un nuevo ejemplo de evolución en tiempo real, que permitió la ganancia del determinante de resistencia a cloranfenicol (*catA1*). No obstante, en este caso no pudimos detectar la presencia de plásmidos diferentes en ambos aislamientos. Durante los años en estudio no se registró oficialmente ningún brote causado por *S. Brandenburg*. Sin embargo, durante el mes de septiembre y principios de octubre de 2000 se observó, en el área V, un incremento en el número de aislamientos de este serotipo, contabilizándose nueve en total. Cinco de ellos pertenecieron al tipo TG-B1 y los otros cuatro al tipo TG-B2, que sólo se diferencian en el perfil de macrorrestricción obtenido con *BlnI* (B7 y B10, respectivamente). Aparentemente, estos perfiles sólo diferían en una banda ($S = 0,84$) y, por tanto, los aislamientos están estrechamente relacionados. Nuevamente, si la relación fuera clonal, los nueve aislamientos podrían haber estado implicados en un brote comunitario no declarado oficialmente.

Como conclusión de los estudios de tipificación podemos destacar que tanto *S. Hadar* como *S. Ohio* parecían formados por unos pocos tipos genéticos muy similares entre si, presentando probablemente una elevada clonalidad. Estos resultados coinciden con los obtenidos en estudios nacionales y europeos (Valdezate *et al.*, 2000; Koort *et al.*, 2002), donde se describen perfiles-PFGE similares a los encontrados en nuestra serie, hecho que apoya la posible dispersión geográfica de un número reducido de clones. Por el contrario, el serotipo *Brandenburg* demostró ser genómicamente heterogéneo, con pocos aislamientos pertenecientes a un mismo tipo. Otros autores encontraron también un número elevado de perfiles diferentes en series de *S. Brandenburg* de pequeño tamaño (Baquar *et al.*, 1994).

3. EL PROBLEMA DE LA RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS EN LOS SEROTIPOS DE SALMONELLA BAJO ESTUDIO

La mayoría de los serotipos no tifoideos de *S. enterica* aislados en países desarrollados se consideran zoonóticos (Threlfall, 2002). En los últimos años se ha producido un considerable aumento de cepas resistentes a antimicrobianos, hecho que parece estar correlacionado, al menos en parte, con el uso de estas moléculas en animales destinados al consumo. Como se comentó en la Introducción, la salmonelosis no tifoidea suele cursar, en seres humanos, como un proceso auto-limitado, quedando confinado al tracto gastrointestinal, por lo cual la terapia antimicrobiana no está indicada. Sin embargo, en el caso de pacientes inmunodeprimidos o en niños resulta de vital importancia contar con tratamientos efectivos. Además, en el tracto intestinal, donde la diversidad bacteriana es muy elevada, *Salmonella* puede mediar la transferencia horizontal de determinantes

de resistencia a la microbiota normal que pueden llegar a actuar como patógenos oportunistas y/o permitir la propagación de resistencias a otros patógenos que interaccionen con ella. Por tanto, el incremento de la resistencia en serotipos no tifoideos de *S. enterica* se ha convertido en un importante problema de salud pública.

En este trabajo, el análisis conjunto de los tres serotipos en estudio reveló que el 36,4% de los aislamientos era susceptible a todos los antimicrobianos analizados, perteneciendo la mayor parte al serotipo Ohio. Por el contrario, tanto *S. Hadar* como *S. Brandenburg* mostraron valores muy altos de resistencia y multiresistencia.

En el caso de *S. Hadar* sólo el 14,3% de los aislamientos fue susceptible. El resto se distribuyó en 12 perfiles R, con un número de resistencias que varió entre una y cinco. Analizando la evolución de estos perfiles en relación al tiempo, los tres mayoritarios (R11: [AMP-CEF]-STR-TET-NAL, R8: STR-TET-NAL y R0: susceptible) aparecieron en aislamientos recogidos a lo largo de todo el periodo de estudio (entre 1995 y 2004), mientras que todos los demás se presentaron de manera esporádica. También se constató un aumento significativo en la incidencia de aislamientos MDR con el tiempo. De hecho, todos los aislamientos sensibles menos uno fueron recogidos entre 1995-1998, período en el cual la MDR era poco común (15,2%). Posteriormente, el porcentaje de aislamientos multiresistentes aumentó de forma progresiva, alcanzando valores del 69,2%, 71,43%, 76,9% y 80% en 1999, 2000, 2001 y 2002-04, respectivamente. El fenotipo MDR mayoritario fue [AMP-CEF]-STR-TET-NAL (perfil R11), con una frecuencia del 40,5%, hecho que contribuyó significativamente a que, de manera individual, las resistencias más comunes fueran tetraciclina (79,8%), estreptomycinina (76,2%), ácido nalidíxico (76,2%) y ampicilina-cefalotina (50%). Las tres primeras alcanzaron durante el período 1999-2004 una incidencia global del 92,1%. Estos resultados son acordes con datos procedentes de otros laboratorios españoles y europeos, incluidos los recogidos en el informe de 2003 del sistema Enter-Net para la vigilancia epidemiológica de salmonelosis humanas (Threlfall *et al.*, 2003). En este informe se destacan las resistencias a tetraciclina, estreptomycinina, ácido nalidíxico y ampicilina como las más frecuentes en los aislamientos de *S. Hadar* de diez países europeos durante 2000 y se indica también la incidencia relativamente alta de MDR (37%).

En el presente trabajo se demostró que las resistencias a estreptomycinina, tetraciclina y ampicilina-cefalotina pudieron atribuirse a la presencia de los genes *strA/B*, *tet(A)* y *bla*_{TEM}. Los genes *strA/B* y *tet(A)* se encontraron en diferentes fragmentos del cromosoma bacteriano, alguno de los cuales sirvió para definir los diferentes perfiles *BlnI*. Por el contrario, la resistencia a ampicilina se encuentra mediada por plásmidos (apartado 4). Por otro lado, todos los aislamientos de *S. Hadar* resistentes a ácido nalidíxico del Principado de Asturias, contenían una mutación que cambia el

codón Asp-87 por Asn en el gen cromosómico *gyrA* y mostraron susceptibilidad disminuida a ciprofloxacino (CMI = 0,5 µg/ml), que es la fluoroquinolona de elección en el caso de infecciones invasivas causadas por *Salmonella*.

Estudios previos, realizados en otros laboratorios, ya habían detectado un número significativo de aislamientos de *S. Hadar*, de distinto origen (humano, animal y alimentos), resistentes a uno o más antimicrobianos y una elevada incidencia de MDR (Threlfall *et al.*, 1999, 2003; Valdezate *et al.*, 2000; Cruchaga *et al.*, 2001). Igualmente, la mayoría de los genes-R encontrados en los aislamientos clínicos de *S. Hadar* recogidos en el Principado de Asturias, ya habían sido descritos en aislamientos de origen humano y animal, principalmente aves de corral, en diferentes países europeos (Frech y Schwarz, 2000; Malorny *et al.*, 2003; Pezzella *et al.*, 2004; Randall *et al.*, 2004). Estos resultados apoyan un posible origen de la resistencia en el reservorio animal.

A diferencia de *S. Hadar*, estudios sobre *S. Brandenburg* realizados en distintos países habían demostrado que la mayoría de los aislamientos analizados eran susceptibles a antimicrobianos (Baquar *et al.*, 1994; Wright *et al.*, 1998; Threlfall *et al.*, 2003; Wybot *et al.*, 2004). Por el contrario, el 56,8% de los recogidos en el Principado de Asturias durante el periodo 1993-2005, presentaron resistencia por lo menos a un antimicrobiano y el 32,4% fueron MDR. Estos resultados, concuerdan, sin embargo, con la situación a nivel nacional, donde se constató un porcentaje elevado de resistencia (72,4%) y multirresistencia (31%) en este serotipo, durante el periodo 2002-2005 (A. Echeita, comunicación personal).

Analizando los perfiles de resistencia de los aislamientos del Principado de Asturias en relación al tiempo, R0 (susceptible a todos los antimicrobianos ensayados) se encontró entre 1995 y 2004 y R12 (AMP-CHL-KAN-STR-SU-TET-TMP) entre 1995-1997, mientras que el resto sólo se presentaron de manera esporádica. Se puso de manifiesto, además, una importante disminución de la resistencia en el año 2000, en el cual la mayoría de los aislamientos (9/10) resultaron susceptibles y solamente uno, procedente de una muestra cárnica, fue resistente a estreptomicina, tetraciclina y trimetoprim (perfil R8). Ya se ha indicado que los datos epidemiológicos obtenidos en el presente estudio sugieren que los aislamientos sensibles del año 2000 podrían haber estado implicados en un brote, que no fue oficialmente informado en su momento (ver apartado 2). Por otro lado, el mayor porcentaje de cepas MDR se concentró entre los años 1995-1999, período que engloba 18 de los 37 aislamientos de la serie, de los cuales nueve (50%) presentaron resistencia a ampicilina, cloranfenicol, kanamicina, estreptomicina, sulfadiacina, tetraciclina y trimetoprim, codificada por los genes *bla_{TEM}*, *catA1*, *aphA1*, *aadA1a*, *sul1* y *sul3*, *tet(A)* o *tet(B)* y *dfrA1*, respectivamente. Uno de ellos fue también resistente a gentamicina, mediada por el gen *aac(3)IV*.

La situación fue marcadamente diferente en el período posterior (2000-2005), que incluye un número similar de aislamientos (17), de los cuales sólo tres fueron MDR (17,7%). Sin embargo, el bajo número de aislamientos recuperados durante los años 2001-2005 así como el impacto del posible brote del año 2000 (con nueve aislamientos sensibles) sobre la incidencia de la MDR, hace tomar con precaución la tendencia hacia su disminución. Por último, señalar que sólo un aislamiento de *S. Brandenburg* (LSP527/95) fue resistente a ácido nalidíxico (debido a una mutación que cambió el Asp-87 del gen *gyrA* a Gly), presentando además susceptibilidad reducida a ciprofloxacino (CMI = 2 µg/ml), cuya base bioquímica y genética aún no ha sido investigada. Dado que el único cambio detectado en el gen *gyrA* no explica el valor de la CMI a ciprofloxacino este aislamiento debe poseer algún mecanismo de resistencia adicional, como puede ser el mediado por bombas de expulsión activa del agente antimicrobiano (Paulsen, 2003).

Aunque la mayoría de los aislamientos de *S. Brandenburg* analizados en este trabajo procedían de muestras clínicas, dos de ellos (LSP26/00 y LSP662/01, ambos resistentes, con perfiles R8 y R9, respectivamente) fueron recuperados de derivados cárnicos. Además, estudios previos llevados a cabo en diferentes países habían descrito aislamientos de origen animal con resistencias a distintos antimicrobianos y portadoras de integrones de clase 1 (Nastasi y Mammina, 2001; White *et al.*, 2003b). Estos datos apoyan nuevamente el origen animal de la resistencia. Sin embargo, la contribución de otros mecanismos de transmisión, incluidas las aguas residuales, también deben considerarse como vector de diseminación e infección. En nuestro estudio sólo se incluyeron dos aislamientos con esta procedencia, uno de *S. Brandenburg* (LSP579/95; sensible a antimicrobianos) y otro de *S. Ohio* (LSP461/94; resistente a sulfadiacina y trimetoprim).

De los tres serotipos analizados, *S. Ohio* fue el que mostró una menor incidencia de resistencia y MDR. De hecho, el 65,5% de los aislamientos (36/55, distribuidos entre 1991 y 2005), resultaron susceptibles a todos los antimicrobianos ensayados, de modo que el perfil R0 fue claramente mayoritario. Los siguientes en frecuencia fueron: R2 (SUL), R9 (AMP-STR-SUL-TET-TMP) y R8 (AMP-GEN-STR-SUL-TET), que sólo incluyeron cinco, tres y dos aislamientos, respectivamente. Por otro lado, diez aislamientos (18,2% del total) presentaron perfiles MDR (R6-R11, con de uno a tres aislamientos), todos ellos encontrados durante 1994-2001.

Consideradas de manera individual, las resistencias a ampicilina, estreptomicina, sulfadiacina, tetraciclina y trimetoprim, así como la combinación trimetoprim-sulfametoxazol, aumentaron durante el período 1994-1996. A partir de 1998 empiezan a declinar, de modo que en 2003 sólo apareció un aislamiento resistente (en concreto a gentamicina y kanamicina). Las resistencias a ampicilina, cloranfenicol, gentamicina, kanamicina, estreptomicina, sulfadiacina,

tetraciclina y trimetoprim se encuentran codificadas por los genes *bla*_{TEM}, *catA1*, *aac(3)II* o *aac(3)IV*, *aphA1*, *aadA1a* o *strA/B*, *sul1*, *tet(B)* y *dfrA1*.

En el caso de *S. Ohio*, existen pocos estudios previos, al tratarse de un serotipo poco frecuente, con baja incidencia de resistencia y MDR (Threlfall *et al.*, 2003; White *et al.*, 2003b). Se han descrito, sin embargo, cepas portadoras de integrones de clase 1 y resistencias a ampicilina, estreptomycin, sulfadiacina, tetraciclina, trimetoprim y/o cloranfenicol, recuperadas de cerdo y de agua de río (Nastasi y Mammina, 2001).

Analizando en conjunto los tres serotipos, destaca el hecho de que en *S. Hadar* sólo se detectó un determinante genético por resistencia. En *S. Brandenburg* y *S. Ohio*, sin embargo, la situación fue diferente, de manera que un mismo fenotipo de resistencia pudo aparecer asociado a más de un genotipo. Por ejemplo, la resistencia a estreptomycin, estuvo mediada por *strA/B* en *S. Hadar*, por *aadA1a* en *S. Brandenburg* y por cualquiera de estos genes en *S. Ohio*. De la misma manera, la resistencia a tetraciclina pudo ser atribuida a *tet(A)* en *S. Hadar*, *tet(B)* en *S. Ohio* y *tet(A)* o *tet(B)* en *S. Brandenburg*. Además, la resistencia a sulfadiacina, no detectada en *S. Hadar*, fue debida a *sul1* en *S. Ohio* y a *sul1* junto con *sul3* en *S. Brandenburg*. En este último serotipo, el mismo perfil fenotípico de resistencia (AMP-CHL-KAN-STR-SUL-TMP-TET) apareció asociado a dos genotipos (perfiles R10 y R12; Tabla 12). En ningún caso se encontró resistencia a beta-lactámicos de espectro extendido, aunque ésta ha sido descrita tanto en *S. Hadar* como en *S. Brandenburg* por otros autores (Politi *et al.*, 2005).

Finalmente, la comparación de los datos obtenidos en el presente estudio para *S. Ohio* y *S. Hadar* con los encontrados en nuestro laboratorio para otros serotipos asociados con aves de corral puso de manifiesto los siguientes hechos:

- Aunque la MDR fue relativamente alta en *S. Panama* (24%) y *S. Virchow* (10%), su incidencia fue considerablemente inferior a la detectada en *S. Hadar* (40,5%) y más parecida a la observada en *S. Ohio* (18,2%). Por el contrario, en *S. Enteritidis*, serotipo cuyo amplio reservorio animal incluye las aves, no se encontraron fenotipos MDR.
- Al igual que sucedía en *S. Hadar*, AMP, STR, NAL y TET fueron las resistencias más comúnmente encontradas en *S. Panama* y *S. Virchow*, mientras que en *S. Ohio* lo fueron AMP, STR y TET y en *S. Enteritidis* sólo fueron frecuentes AMP y NAL (Soto *et al.*, 2000, 2001, 2003a; Martín *et al.*, 2001; Martínez *et al.*, 2005).
- Coincidiendo con los dos serotipos en estudio, la resistencia a ampicilina en otros serotipos aviares se encontraba codificada por genes *bla*_{TEM}, no habiéndose detectado aislamientos positivos para *bla*_{OXA} ni para *bla*_{PSE} (Soto *et al.*, 2001, 2003a; del Cerro *et al.*, 2003).

- Mientras que en *S. Hadar* no se encontraron integrones de clase 1, en los otros serotipos aviares la resistencia a estreptomicina estuvo mediada por genes *strA/B* y/o *aadA1a*, este último localizado con frecuencia en integrones de clase 1 (Guerra *et al.*, 2000a; Soto *et al.*, 2000, 2001; del Cerro *et al.*, 2003; Martínez *et al.*, 2005).
- Aunque en grado menor al registrado en *S. Hadar*, en *S. Panama*, *S. Virchow* y *S. Enteritidis* (pero no en *S. Ohio*), también se observó un aumento significativo de la resistencia a ácido nalidíxico junto con una disminución de susceptibilidad a ciprofloxacino que, como se indicó anteriormente, es la fluoroquinolona de elección en el caso de infecciones invasivas por *Salmonella* (Martín *et al.*, 2001; Soto *et al.*, 2001, 2003a;). El análisis de la secuencia de los genes *gyrA* de los distintos serotipos indicó que la resistencia a ácido nalidíxico se debía fundamentalmente a mutaciones que afectan a los codones Asp-87 o Ser-83 (del Cerro *et al.*, 2003; Soto *et al.*, 2003a; Martínez *et al.*, 2005). Sin embargo, las bases genéticas de la disminución de la susceptibilidad a ciprofloxacino aún no han sido estudiadas.

4. LOS ELEMENTOS GENÉTICOS MÓVILES IMPLICADOS EN LA RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS EN LOS SEROTIPOS DE SALMONELLA BAJO ESTUDIO

La asociación de un sistema de captura y expresión de genes con elementos dotados de movilidad vertical y horizontal presenta una gran importancia en el flujo natural de genes-R, sobre todo teniendo en cuenta que en numerosas ocasiones se han descrito plásmidos conjugativos de amplio rango de hospedador portadores de transposones e integrones. La transferencia horizontal es de especial interés en patógenos humanos y animales, entre los que destacan los causantes de zoonosis y los de transmisión alimentaria, como *Salmonella*. De hecho, dentro de este género se han detectado diferentes tipos de integrones de clase 1 asociados a transposones tipo Tn21, de ubicación tanto cromosómica como plasmídica (Liebana *et al.*, 2002; Pérez-Moreno *et al.*, 2005; Villa y Carattoli, 2005; Antunes *et al.*, 2006), siendo de señalar los encontrados por nuestro grupo de trabajo en aislamientos del Principado de Asturias (Guerra *et al.*, 2001, 2002, 2004a; Soto *et al.*, 2001, 2003a, b; Rodríguez *et al.*, 2006a, b).

Cabe destacar que en ninguno de los aislamientos del serotipo Hadar se detectó la presencia de integrones, mientras que todos los aislamientos MDR de *S. Brandenburg* y *S. Ohio* presentaron un integrón de clase 1 que contenía los genes *dfrA1* y *aadA1a* en su región variable de 1600 pb. Los integrones con esta RV están ampliamente distribuidos en *S. enterica*, encontrándose con anterioridad en aislamientos de diferentes serotipos recogidos en distintos países, a partir de muestras clínicas, animales y/o de alimentos de origen animal (Guerra *et al.*, 2000a; Soto *et al.*,

2001, 2003a; Daly *et al.*, 2004; Pezzella *et al.*, 2004; Nógrády *et al.*, 2005; Miko *et al.*, 2005; Antunes *et al.*, 2005). Sin embargo, su estructura raramente ha sido analizada en detalle (Daly *et al.*, 2005).

Los integrones de *S. Brandenburg* y *S. Ohio* caracterizados en el presente trabajo se encuentran insertados en transposones de la subfamilia Tn21 (Liebert *et al.*, 1999). Los miembros de esta subfamilia comparten la misma maquinaria de transposición y portan un integrón de clase 1, pero se diferencian en el tipo y/o número de casetes génicas contenidas en el integrón (*aadA1* en In2 de Tn21), la presencia o no de un operón *mer* intacto y la asociación o no a secuencias de inserción y/o transposones adicionales.

La figura 48 muestra un modelo de evolución de la subfamilia Tn21 (Brown *et al.*, 1996; Liebert *et al.*, 1999), que probablemente se originó a partir de un transposón ancestral que confería resistencia a mercurio (equivalente al Tn2613 actual). El miembro más antiguo del grupo es Tn2411, descubierto en el plásmido R1 de *S. Paratyphi*, en el Reino Unido (Kopecko *et al.*, 1976). Este transposón contiene un integrón con la casete *aadA1* y porta, además, la secuencia de inserción IS1326. Por su parte, Tn21 fue detectado por primera vez en Japón dentro del plásmido NR1 de *Sh. flexneri* y podría derivar de un elemento ancestral equivalente a Tn2411, por adquisición de una segunda secuencia de inserción (IS1353). Por el contrario, la escisión de IS1326 habría originado una rama diferente de transposones que carecen de ambas secuencias de inserción. En esta rama se incluyen los transposones Tn2608 y Tn5086, cuyos integrones contienen las casetes *aadA1* y *dfrA7*, respectivamente.

Los transposones encontrados en *S. Brandenburg* y *S. Ohio* en este trabajo podrían derivar de Tn2608 por inserción de la casete *dfrA1*. En algunos aislamientos de *S. Brandenburg* la pérdida de IS1326 estuvo aparentemente acompañada de una delección que afectó al extremo 3' del gen *tniB1*, manteniéndose intacto el gen *tniA*, cuya asociación con *orf5* y con el operón *mer* pudo ser demostrada (In-Sb1). En el caso de *S. Ohio* y de los restantes aislamientos de *S. Brandenburg* la escisión de IS1326 también iría asociada a una delección que afectó no sólo al gen *tniB1* sino también a *tniA*, ocurriendo además (simultáneamente o en una etapa diferente), la inserción de ADN adicional (In-Sb2 e In-So1). Esto último puede deducirse de la imposibilidad de asociar *urf2* (gen de función desconocida que precede al operón *mer* en transposones de tipo Tn21) con *orf5* del integrón, a pesar de que ambos genes se encuentran presentes. Cuatro de los seis elementos de *S. Ohio* con esta última estructura contienen además una delección en el gen *tnpA* que codifica la transposasa de Tn21.

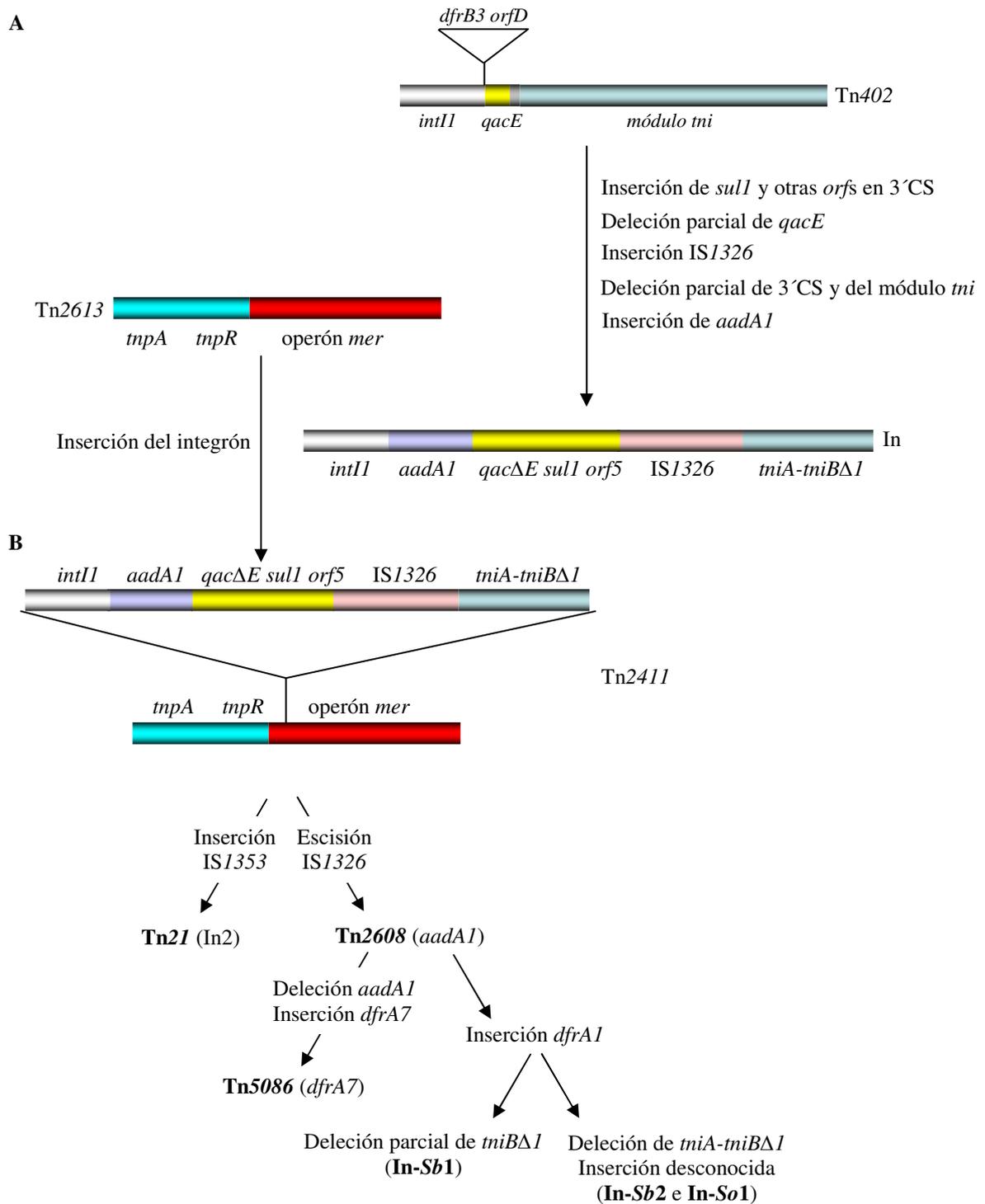


Figura 48. Evolución de los integrones de clase 1 a partir de un transposón de tipo Tn402 (A) y de los transposones de la subfamilia Tn21 (Brown *et al.*, 1996; Liebert *et al.*, 1999), incluyendo en el esquema los detectados en esta tesis para *S. Brandenburg* y *S. Ohio* (B)

Como se ha descrito previamente para otros miembros de la subfamilia Tn21 (Liebert *et al.*, 1999), todos los elementos de este tipo caracterizados en esta tesis pertenecientes a *S. Brandenburg* y dos de los encontrados en *S. Ohio* (aislamientos LSP191/98 y LSP26/01) están insertados en un transposón de tipo Tn9, que aporta el gen *catA1*, que confiere resistencia a cloranfenicol. Sin embargo, en cuatro aislamientos de *S. Ohio* sensibles a cloranfenicol (LSP131/96, LSP199/96, LSP557/96 y LSP209/98) no se detectaron las secuencias utilizadas como indicadoras de Tn9 (*IS1* y *catA1*) y se puso de manifiesto, además, la existencia de una delección en el gen *tnpA* que codifica la transposasa de Tn21.

En aislamientos de *S. Brandenburg* y *S. Ohio*, el gen *tet(B)* de resistencia a tetraciclina se encuentra asociado a transposones de tipo Tn10, mientras que en aislamientos de *S. Brandenburg* portadores del gen *tet(A)*, este se localiza en transposones de tipo Tn1721. Tn1721 ya había sido detectado con anterioridad formando parte de plásmidos conjugativos en varios serotipos de *Salmonella* procedentes de diferentes muestras. La mayoría de los genes *tet(A)* han sido descritos dentro de una versión delecionada del Tn1721 que carece de la región izquierda, incluyendo los genes *mcp*, *tnpR* y *tnpA* (Frech y Schwarz, 1999; Pezzella *et al.*, 2004). En un aislamiento de *S. Typhimurium*, resistente a tetraciclina y ampicilina, la región derecha del Tn1721 delecionado que aporta los genes *tet(A)* y *tetR*, se encontró anclada al transposón Tn3, que proporciona el gen *bla_{TEM-135}* (Pasquali *et al.*, 2005). Sin embargo, el transposón de tipo Tn1721 encontrado en los aislamientos de *S. Brandenburg* caracterizados en este trabajo, contiene intactos los brazos derecho e izquierdo, pero presenta alteraciones en la región central, ya que no conseguimos asociar los genes *tnpA* y *tetR*. También se encontraron alteraciones en los transposones de tipo Tn10 de *S. Brandenburg* y *S. Ohio*, donde no fue posible amplificar los genes *tetD* y *tetC*, ni asociar los genes *tet(B)* y *tnpR*. De hecho, la presencia de este último ni siquiera pudo ser demostrada. En el plásmido pHCM1 del serotipo Typhi, la inserción de diferentes genes de resistencia (*catI*, *bla_{TEM-1}*, *sulIII*, *strA/B*) mediada por ISs provocó la interrupción del gen *tetC* y la pérdida de *tetD* (Parkhill *et al.*, 2001). En *S. Brandenburg* y *S. Ohio*, los resultados obtenidos apoyan la inserción de ADN adicional, que pudo haber acompañado a la delección (total o parcial) de *tetC* y *tetD*. De manera similar se justificaría la posible inserción de ADN adicional entre los genes *tnpA* y *tetR* del transposón Tn1721 de *S. Brandenburg*, cuya asociación tampoco pudo ser establecida.

Por otro lado, todos los aislamientos MDR de *S. Brandenburg* presentaron dos genes diferentes de resistencia a sulfonamidas: *sulI* (como parte integral del integron de clase 1) y *sul3*. Este último fue descrito por primera vez en cepas de *E. coli* aisladas de cerdo en Suiza (Perreten y Boerlin, 2003) y desde entonces ha sido encontrado también en distintos serotipos de *Salmonella*, procedentes de diversas fuentes, en Alemania y Portugal. (Guerra *et al.*, 2004b; Antunes *et al.*,

2005). Igual que sucede con los aislamientos de *S. Brandenburg* analizados en este trabajo, una cepa de *S. Typhimurium* aislada en Portugal presentaba los genes *sul1* y *sul3* junto con un integrón de clase 1 con la región RV de 1600 pb/*dfrA1-aadA1*. Todos los aislamientos de *S. Ohio* resistentes a sulfonamidas (17 en total) contenían el gen *sul1*, aunque sólo en seis de ellos éste se localizó en el integrón de clase 1, junto con los genes *aadA1a* y *dfrA1* responsables de la resistencia a estreptomocina y trimetoprim.

En los aislamientos MDR de *S. Brandenburg* todos los genes de resistencia, a excepción del *aac(3)-IV* (perfil R12), así como el integrón y transposones detectados, se localizaron en plásmidos conjugativos (pUO-*SbR1*-pUO-*SbR5*) de gran tamaño (entre 200 y 300 Kb). Considerando la alta heterogenicidad genómica de este serotipo, parece lógico asumir que la transmisión horizontal de estos plásmidos ha desempeñado un papel esencial en la diseminación de las resistencias. En aislamientos MDR de *S. Ohio* (perfiles R9 a R11) también se encontraron plásmidos de tamaño relativamente grande (pUO-*SoR1*-pUO-*SoR4*; entre 145 y 190 Kb). Sólo dos de ellos (pUO-*SoR3* y pUO-*SoR4*) pudieron ser transferidos a *E. coli* mediante conjugación y ninguno mediante transformación. En los dos plásmidos conjugativos se comprobó la presencia de todos los genes de resistencia, el integrón de clase 1 y los transposones detectados en los aislamientos portadores (LSP191/98 y LSP26/01, respectivamente). Además, mediante experimentos de hibridación, se comprobó que en todas las cepas portadoras de integrones, éstos se localizan en los plásmidos identificados. Es interesante destacar que, aunque todos los plásmidos conjugativos portadores del integrón en cepas de *S. Brandenburg* positivas para *tet(B)*, transfirieron la casete *aadA1a* a *E. coli*, la bacteria receptora no manifestó el fenotipo de resistencia a estreptomocina. Aunque por el momento no tenemos explicación para este resultado, la expresión diferencial de *aadA1*, dependiente del hospedador, ya había sido observada por otros autores. Por ejemplo, esta casete presente en un integrón de *S. Newport*, que también contenía *dfrA1*, no confirió resistencia a estreptomocina en el aislamiento portador, pero sí en *E. coli*, una vez trasferida por conjugación (Zhao *et al.*, 2003).

Cabe destacar, además, que estudios previos de nuestro laboratorio ya habían revelado la presencia de grandes plásmidos, portadores de integrones de clase 1 con la región RV de 1600 pb/*dfrA1-aadA1*, en los serotipos Wien y Typhimurium (Soto *et al.*, 2003b; I. Rodríguez, comunicación personal). En el futuro, estos plásmidos serán comparados con los encontrados en *S. Brandenburg* y *S. Ohio*.

Como se comentó anteriormente, los aislamientos de *S. Hadar* analizados en este trabajo no contenían integrones. Sin embargo, si se detectaron en ellos distintos plásmidos de resistencia, cuyo tamaño fue inferior (9 a 95 Kb) al de los encontrados en *S. Ohio* y sobre todo en *S. Brandenburg*.

Cuatro de ellos (pUO-*ShR2* a pUO-*ShR5*) fueron conjugativos, mientras que pUO-*ShR1* (de 9 Kb) sólo pudo ser transferido a *E. coli* bien mediante transformación, o bien movilizado por pUO-*ShR5* (95 Kb). Todos estos plásmidos contenían el gen *bla*_{TEM}, que confiere resistencia a ampicilina y cefalotina. Además, pUO-*ShR3*, presente en el único aislamiento resistente a trimetoprim (LSP186/98), portaba el gen *dfrA1* y pUO-*ShR5* (LSP481/01) los genes *aac(3)-IV* y *strA/B* de resistencia a gentamicina y estreptomicina.

5. APORTACIONES DE LAS DIFERENCIAS EN LOS PERFILES DE GENES DE VIRULENCIA EN SALMONELLA

Los estudios llevados a cabo en el marco de esta tesis mostraron que en cuanto a virulencia, las variaciones inter-serotipo e intra-serotipo están muy limitadas. La mayoría de los genes rastreados se encontraron en todos los aislamientos analizados y las únicas diferencias afectaron a los genes *agfA* (fimbrias), *sugR* y *rhuM* (SPI3), *pipA* (SPI5), *sopE* (efector), *sodC1* (resistencia al estrés oxidativo) y *sefD* (fimbrias). Estas diferencias permitieron establecer cinco perfiles V, con sólo uno (en el caso de *S. Ohio*) o dos (*S. Hadar* y *S. Brandenburg*) por serotipo.

De acuerdo con la información disponible (Rotger y Casadesus, 1999; van Asten y van Dijk, 2005), en ninguno de los tres serotipos se detectó un plásmido de virulencia, mientras que todos los aislamientos analizados portaban secuencias correspondientes a las cinco SPIs cromosómicas. No obstante, el serotipo Brandenburg presenta una delección en SPI5, al no encontrarse el gen *pipA*, mientras que los serotipos Hadar y Ohio contienen delecciones en SPI3, con ausencia de los genes *sugR* y *rhuM* en el primero y restringida a parte del gen *sugR* en el segundo. La amplificación del gen *sugR* de *S. Ohio* generó un fragmento de tamaño muy inferior al esperado. La secuenciación y posterior comparación de la secuencia obtenida con las depositadas en las bases de datos mostró una delección interna, que afecta a 515 pb localizadas entre las posiciones 522-1036 del gen *sugR* de *S. Typhimurium* (AF106566). Este mismo resultado había sido obtenido por Amavisit *et al.* (2003) al analizar las variaciones en las SPIs de aislamientos de *S. enterica* pertenecientes a 13 serotipos diferentes, entre ellos tres cepas de *S. Ohio*. Es interesante destacar que la región de *S. Typhimurium* delecionada en *S. Ohio* se encuentra flanqueada por repeticiones directas imperfectas: cagcgccttttc/cagcgc-atttc. Por ello, la delección del gen *sugR* del serotipo Ohio podría atribuirse a un proceso de recombinación entre dichas repeticiones, sobre todo teniendo en cuenta la presencia de la secuencia cagcgc-atttc en el punto donde ocurrió la delección (Fig. 49). La recombinación entre secuencias repetidas en orientación directa es un proceso frecuente, capaz de generar importantes alteraciones en la estructura de los genomas.

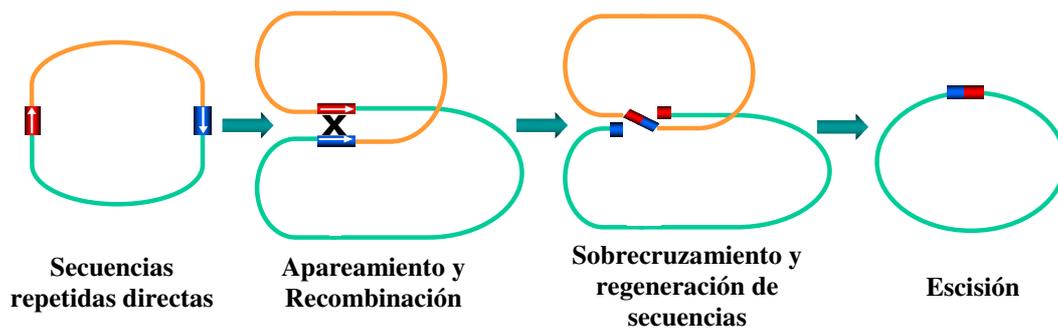


Figura 49. Delección genómica por recombinación entre secuencias repetidas directas

En cuanto a los genes no agrupados en islas, todos los aislamientos del serotipo Ohio se caracterizaron por la presencia de *sodCI* y *sefD* (que no se encontraron en los otros serotipos) y la ausencia de *sopE*. La presencia de este último gen mostró variaciones intra-serotipo, encontrándose en el 90,5% de los aislamientos de *S. Hadar*, pero no en el 94,6% de los aislamientos de *S. Brandenburg*. Además, característica de *S. Hadar* es la ausencia del gen *agfA*, presente en los otros dos serotipos.

Finalmente, a pesar de que tanto *S. Brandenburg* como *S. Hadar* presentaron dos perfiles-V, no se encontró una correlación entre éstos y la capacidad de originar infecciones extraintestinales. Así, los dos aislamientos de *S. Brandenburg* implicados en este tipo de infecciones presentaron el perfil de virulencia mayoritario (V3), no diferenciándose, por tanto, del 94% de los aislamientos que sólo provocaron gastroenteritis aguda. En el caso de los tres aislamientos de *S. Hadar* asociados a infecciones focales, uno de ellos mostró el perfil V1 (mayoritario) y dos el perfil V2, al igual que otros seis aislamientos no implicados en infecciones extraintestinales. Esta falta de correlación entre las diferencias minoritarias encontradas a nivel de genes de virulencia y las consecuencias de la infección, no difiere de los datos obtenidos con anterioridad para otros serotipos no tifoideos de *S. enterica* en nuestro laboratorio (del Cerro *et al.*, 2003; Herrero *et al.*, 2006; Rodríguez *et al.*, 2006d; Soto *et al.*, 2006). En *Salmonella*, al igual que en muchas otras bacterias patógenas, la virulencia es un proceso multifactorial, que requiere la actuación de un gran número de genes, muchos de los cuales son redundantes (Marcus *et al.*, 2000). Por ello, la mutación o delección de uno de ellos, no siempre se traduce en un efecto manifiesto. Además, la presencia de un gen de virulencia en una bacteria, no implica necesariamente que éste se exprese en un determinado hospedador y/o en determinadas condiciones (Streckel *et al.*, 2004; Rahman, 2006). Por último, hay que tener presente que el desarrollo de la enfermedad no sólo depende de la bacteria, sino también del estado del hospedador, que puede condicionar en gran medida la gravedad de la patología desarrollada (Hohmann, 2001).

Conclusiones

1. La amplificación mediante PCR de secuencias aleatorias (RAPD) y el análisis de macrorrestricción genómica, seguida de electroforesis en campo pulsante (PFGE), son métodos de valor probado en la tipificación de *Salmonella*. El primero, más rápido y económico, presentó sin embargo problemas de amplificación de bandas no constantes, lo que dificultó la interpretación de resultados, y una baja discriminación intra-serotipo. Por el contrario, la macrorrestricción con *XbaI* y/o *BlnI* resultó altamente reproducible, los perfiles obtenidos fueron fácilmente interpretables, y permitió una buena diferenciación inter- e intra-serotipo.

2. La utilización de técnicas de tipificación, junto con la determinación de los perfiles de resistencia a antimicrobianos y de virulencia, permitió identificar los tipos genómicos de *S. Hadar*, *S. Brandenburg* y *S. Ohio*, que circularon en el Principado de Asturias durante el periodo 1991-2005. Se determinó cuales de ellos eran endémicos, cuales esporádicos y cuales estuvieron implicados en brotes.

3. En el estudio de sensibilidad a antimicrobianos:

a) Se detectó un fuerte incremento de la resistencia a ácido nalidíxico acompañada de una disminución en la susceptibilidad a ciprofloxacino en el serotipo Hadar, características compartidas por el 100% de los aislamientos del periodo 1999-2003. Solamente un aislamiento del serotipo Brandenburg presentó este fenotipo que, sin embargo, no fue observado en ninguno del serotipo Ohio.

b) En el serotipo Ohio se detectó un predominio de aislamientos sensibles (65%) y un porcentaje relativamente bajo de aislamientos con resistencia a múltiples drogas (18%). Por el contrario, sólo el 14% de los aislamientos del serotipo Hadar fueron sensibles a todos los antimicrobianos ensayados, y el 40% fueron multirresistentes. En el serotipo Brandenburg la situación fue intermedia, ya que el 43% de los aislamientos fue sensible y el 32% multirresistente.

c) En los tres serotipos estudiados las resistencias individuales encontradas con mayor frecuencia fueron ampicilina, estreptomina y tetraciclina. En los serotipos Brandenburg y Ohio también se observó una elevada incidencia de resistencia a sulfadiacina y trimetoprim, mientras que sólo un aislamiento del serotipo Hadar fue resistente a trimetoprim y ninguno a sulfadiacina.

4. Destaca la ausencia de integrones en el serotipo Hadar, y su presencia en aislamientos multirresistentes de los serotipos Brandenburg y Ohio. Todos los integrones detectados compartieron la misma región variable (1600 pb/*dfrA1-aadA1*) y los genes *sulI-qacEΔ1* de la región constante 3', aunque se observaron diferencias en otros componentes (genes *tniA-tniBΔ1*).

5. Los integrones formaron parte de transposones de la subfamilia del Tn21, con dos estructuras diferentes en el caso de *S. Brandenburg*, una de las cuales fue similar a la única detectada en *S. Ohio*. Además, en los aislamientos resistentes a cloranfenicol, estos transposones se encuentran flanqueados por secuencias del Tn9. Otros transposones identificados fueron del tipo Tn10, tanto en aislamientos de *S. Brandenburg* como de *S. Ohio* portadores del gen *tet(B)*, y Tn1721, sólo en aislamientos *S. Brandenburg* positivos para el gen *tet(A)*.

6. En los tres serotipos se identificaron plásmidos de resistencia de gran tamaño, mediante digestión con nucleasa S1, electroforesis en campo pulsante e hibridación con sondas específicas para genes-R. La mayoría fueron conjugativos y, frecuentemente, codificaron la totalidad del fenotipo-R del aislamiento portador. En los serotipos *Brandenburg* y *Ohio*, los plásmidos de resistencia contenían también el integrón y distintos transposones. Estos plásmidos son de nueva descripción.

7. Los aislamientos analizados se distribuyeron en cinco perfiles de virulencia: dos en *S. Hadar*, dos en *S. Brandenburg* y uno en *S. Ohio*. Cada serotipo presentó al menos un perfil-V característico, aunque sólo se encontraron pequeñas diferencias intra-serotipo. La mayoría de éstas ocurrieron en las regiones menos conservadas de las islas de patogenicidad 3 y 5, o afectaron a la presencia o ausencia de cuatro genes: dos de ellos implicados en la producción de fimbrias, uno de codificación fágica y otro relacionado con resistencia al estrés oxidativo. En ninguno de los aislamientos analizados se encontraron plásmidos de virulencia.

Bibliografía

- Abrahams, G. L. y M. Hensel.** 2006. Manipulating cellular transport and immune responses: dynamic interactions between intracellular *Salmonella enterica* and its host cells. *Cell Microbiol.* **8**: 728-37.
- Ahmed, A. M., H. Nakano y T. Shimamoto.** 2005. Molecular characterization of integrons in non-typhoid *Salmonella* serovars isolated in Japan: description of an unusual class 2 integron. *J. Antimicrob. Chemother.* **54**: 273-8.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller y D. J. Lipman.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.
- Amavisit, P., D. Lightfoot, G. F. Browning y P. F. Markham.** 2003. Variation between Pathogenic Serovars within *Salmonella* Pathogenicity Islands. *J. Bacteriol.* **185**: 3624-35.
- Antunes, P., J. Machado, J. C. Sousa y L. Peixe.** 2005. Dissemination of sulfonamide resistance genes (*sul1*, *sul2*, and *sul3*) in Portuguese *Salmonella enterica* strains and relation with integrons. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**: 836-9.
- Antunes, P., J. Machado y L. Peixe.** 2006. Characterization of antimicrobial resistance and class 1 and 2 integrons in *Salmonella enterica* isolates from different sources in Portugal. *J. Antimicrob. Chemother.* **58**: 297-304.
- Arlet, G. y A. Phillippon.** 1991. Construction by polymerase chain reaction and intragenic DNA probes for three main types of transferable β -lactamases (TEM, SHV, CARB). *FEMS Microbiol. Lett.* **82**: 19-26.
- Bager, F. y R. Helmuth.** 2001. Epidemiology of resistance to quinolones in *Salmonella*. *Vet. Res.* **32**: 285-90.
- Bannister, J. V., W. H. Bannister y G. Rotilio.** 1987. Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *CRC Crit. Rev. Biochem.* **22**: 111-80.
- Baquer, N., A. Burnens y J. Stanley.** 1994. Comparative evaluation of molecular typing of strains from a national epidemic due to *Salmonella* Brandenburg by rRNA gene and IS200 probes and pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* **32**: 1876-80.
- Baquero, F.** 2004. From pieces to patterns: evolutionary engineering in bacterial pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**: 510-8.
- Barton B. M., G. P. Harding y A. J. Zuccarelli.** 1995. A general method for detecting and sizing large plasmids. *Anal. Biochem.* **226**: 235-40.
- Basnyat, B., A. P. Maskey, M. D. Zimmerman y D. R. Murdoch.** 2005. Enteric (typhoid) fever in travelers. *Clin. Infect. Dis.* **41**: 1467-72.

- Bäumler, A. J., R. M. Tsois, A. W. M. van der Velden, I. Stojiljkovic, S. Anic y F. Heffron.** 1996a. Identification of a new iron regulated locus of *Salmonella* Typhi. *Gene*. **183**: 207-13.
- Bäumler, A. J., R. M. Tsois, F. A. Bowe, J. G. Kusters, S. Hoffmann y F. Heffron.** 1996b. The *pef* fimbrial operon of *Salmonella* Typhimurium mediates adhesion to murine small intestine and is necessary for fluid accumulation in the infant mouse. *Infect. Immun.* **64**: 61-8.
- Bäumler, A. J., F. Heffron y R. Reissbrodt.** 1997a. Rapid detection of *Salmonella enterica* with primers specific for *iroB*. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 1224-30.
- Bäumler, A. J., A. J. Gilde, R. M. Tsois, A. W. M. Van der Velden, B. M. M. Ahmer y F. Heffron.** 1997b. Contribution of horizontal gene transfer and deletion events to development of distinctive patterns of fimbrial operons during evolution of *Salmonella* serotypes. *J. Bacteriol.* **179**: 317-22.
- Bäumler, A. J., R. M. Tsois, T. A. Ficht, y L. G. Adams.** 1998. Evolution of host adaptation in *Salmonella enterica*. *Infect. Immun.* **66**: 4579-87.
- Blanc-Potard, A. B. y E. A. Groisman.** 1997. The *Salmonella selC* locus contains a pathogenicity island mediating intramacrophage survival. *EMBO J.* **16**: 5376-85.
- Blanc-Potard, A. B., F. Solomon, J. Kayser y E. A. Groisman.** 1999. The SPI-3 pathogenicity island of *Salmonella enterica*. *J. Bacteriol.* **181**: 998-1004.
- Bej, A. K., M. H. Mahbubani, M. J. Boyce y R. M. Atlas.** 1994. Detection of *Salmonella* spp. in oysters by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 368-73.
- Benenson, S., D. Raveh, Y. Schlesinger, J. Alberton, B. Rudensky, I. Hadas-Halpern y A. M. Yinnon.** 2001. The risk of vascular infection in adult patients with nontyphi *Salmonella* bacteremia. *Am. J. Med.* **110**: 60-3.
- B. E. S.** 2004. Resultados de la declaración al Sistema de Información Microbiológica. **12**: 294.
- B. E. S.** 2005. Resultados de la declaración al Sistema de Información Microbiológica. **13**: 271.
- Bjorkman, P., A. Nilsson y K. Riesbeck.** 2002. A pilot with pain in his leg: thigh abscess caused by *Salmonella enterica* serotype Brandenburg. *J. Clin. Microbiol.* **40**: 3530-1.
- Bowe, F., C. J. Lipps, R. M. Tsois, E. Groisman, F. Heffron y J. G. Kusters.** 1998. At least four percent of the *Salmonella* Typhimurium genome is required for fatal infection of mice. *Infect. Immun.* **66**: 3372-7.
- Boyd, D., A. Cloeckert, E. Chaslus-Dancla y M. R. Mulvey.** 2002. Characterization of variant *Salmonella* genomic island 1 multidrug resistance regions from serovars Typhimurium DT104 and Agona. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**: 1714-22.

- Brown, H. J., H. K. Stokes y R. M. Hall.** 1996. The integrons In0, In2, and In5 are defective transposon derivatives. *J Bacteriol.* **178:** 4429-37.
- Caers, J., P. Peeters, K. Vanden Houte, J. Sennesael, P. Van der Niepen y D. Verbeelen.** 2006. Acute interstitial nephritis associated with salmonellosis. *Eur. J. Intern. Med.* **17:** 217-9.
- Canton, R, T. M. Coque y F. Baquero.** 2003. Multi-resistant Gram-negative bacilli: from epidemics to endemics. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **16:** 315-25.
- Carattoli, A.** 2001. Importance of integrons in the diffusion of resistance. *Vet. Res.* **32:** 243-59.
- Carattoli, A., E. Filetici, L. Villa, A. M. Dionisi, A. Ricci e I. Luzzi.** 2002. Antibiotic resistance genes and *Salmonella* genomic island 1 in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated in Italy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46:** 2821-8.
- del Cerro, A., S. M. Soto, E. Landeras, M. A. Gonzalez-Hevia y M. C. Mendoza.** 2002. PCR-based procedures in detection and DNA-fingerprinting of *Salmonella* from samples of animal origin. *Food Microbiol.* **19:** 567-75.
- del Cerro, A., S. M. Soto y M. C. Mendoza.** 2003. Virulence and antimicrobial-resistance gene profiles determined by PCR-based procedures for *Salmonella* isolated from samples of animal origin. *Food Microbiol.* **20:** 431-8.
- Chen, S., S. Zhao, D. G. White, C. M. Schroeder, R. Lu, H. Yang, P. F. McDermott, S. Ayers y J. Meng.** 2004. Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Salmonella* serovars isolated from retail meats. *Appl. Environ. Microbiol.* **70:** 1-7.
- Chiu C. H. y J. T. Ou.** 1996. Rapid identification of *Salmonella* serovars in feces by specific detection of virulence genes, *invA* and *spvC*, by an enrichment broth culture-multiplex PCR combination assay. *J. Clin. Microbiol.* **34:** 2619-22.
- Chiu C. H., L. H. Su y C. Chu.** 2004. *Salmonella enterica* serotype Choleraesuis: epidemiology, pathogenesis, clinical disease, and treatment. *Clin. Microbiol. Rev.* **17:** 311-22. Review.
- Chiu, C. H., P. Tang, C. Chu, S. Hu, Q. Bao, J. Yu, Y. Y Chou, H. S. Wang y Y. S. Lee.** 2005. The genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis, a highly invasive and resistant zoonotic pathogen. *Nucleic. Acids Res.* **33:** 1690-8.
- Chu, C., C. H. Chiu, W. Y. Wu, C. H. Chu, T. P. Liu y J. T. Ou.** 2001. Large drug resistance virulence plasmids of clinical isolates of *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45:** 2299-303.
- Clouthier, S. C., S. K. Collinson y W. W. Kay.** 1994. Unique fimbriae-like structures encoded by *sefD* of the SEF14 fimbrial gene cluster of *Salmonella* Enteritidis. *Mol. Microbiol.* **12:** 893-903.

- Collazo, C. M. y J. E. Galán.** 1997. The invasion-associated type-III protein secretion system in *Salmonella*-a review. *Gene*. **192**: 51-9.
- Connor, B. y E. Schwartz.** 2005. Typhoid and paratyphoid fever in travellers. *Lancet Infect. Dis.* **5**: 623-8.
- Corral, J. L. y E. J. Perea.** 1992. *Salmonella*. En: Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. E. J. Perea (ed.). Ed. Dogma, Barcelona. pp. 647-61.
- Cruchaga, S., A. Echeita, A. Aladueña, J. Garcia-Pena, N. Frias y M. a. Usera.** 2001. Antimicrobial resistance in salmonellae from humans, food and animals in Spain in 1998. *J. Antimicrob. Chemother.* **47**: 315-21.
- Dahlberg, C. y M. Hermansson.** 1995. Abundance of Tn3, Tn21, and Tn501 transposase (*tnpA*) sequences in bacterial community DNA from marine environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 3051-6.
- Daly, M., J. Buckley, E. Power y S. Fanning.** 2004. Evidence for a chromosomally-located third integron in *Salmonella* Typhimurium DT104b. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**: 1350-2.
- Daly, M., L. Villa, C. Pezzella, S. Fanning y A. Carattoli.** 2005. Comparison of multidrug resistance gene regions between two geographically unrelated *Salmonella* serotypes. *J. Antimicrob. Chemother.* **55**: 558-61.
- Doran, J. L., S. K. Collinson, J. Burian, G. Sarlos, E. C. Todd, C. K. Munro, C. M. Kay, P. A. Banser, P. I. Peterkin y W. W. Kay.** 1993. DNA-based diagnostic tests for *Salmonella* species targeting *agfA*, the structural gene for thin aggregative fimbriae. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 2263-73.
- Dorsey, C. W., M. C. Laarakker, A. D. Humphries, E. H. Weening y A. J. Bäumlner.** 2005. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium MisL is an intestinal colonization factor that binds fibronectin. *Mol. Microbiol.* **57**: 196-211.
- Doublet, B., F. X. Weill, L. Fabre, E. Chaslus-Dancla y A. Cloeckaert.** 2004a. Variant *Salmonella* genomic island 1 antibiotic resistance gene cluster containing a novel 3'-N-aminoglycoside acetyltransferase gene cassette, *aac(3)-Id*, in *Salmonella enterica* serovar Newport. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**: 3806-12.
- Doublet, B., A. Carattoli, J. M. Whichard, D. G. White, S. Baucheron, E. Chaslus-Dancla y A. Cloeckaert.** 2004b. Plasmid-mediated florfenicol and ceftriaxone resistance encoded by the *floR* and *bla*_(CMY-2) genes in *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Newport isolated in the United States. *FEMS Microbiol. Lett.* **233**: 301-5.

- Echeita, M. A., S. Herrera, J. Garaizar y M. A. Usera.** 2002. Multiplex PCR-based detection and identification of the most common *Salmonella* second-phase flagellar antigens. Res. Microbiol. **153**:107-13.
- Echeita, M. A., A. M. Aladueña, R. Diez, M. Arroyo, F. Cerdan, R. Gutierrez, M. de la Fuente, R. Gonzalez-Sanz, S. Herrera-Leon y M. A. Usera.** 2005a. Distribución de los serotipos y fagotipos de *Salmonella* de origen humano aislados en España en 1997-2001. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. **23**: 127-34.
- Echeita, A., A. Aladueña, R. Gonzalez-Sanz, R. Diez, M. de la Fuente, F. Cerdán, M. Arroyo y R. Gutierrez.** 2005b. Análisis de las cepas de *Salmonella* spp aisladas de muestras clínicas de origen humano en España. Años 2002 y 2003 (I). B. E. S. **13**: 73-6.
- Echeita, A., A. Aladueña, R. Gonzalez-Sanz, R. Diez, M. de la Fuente, F. Cerdán, M. Arroyo y R. Gutierrez.** 2005c. Análisis de las cepas de *Salmonella* spp aisladas de muestras clínicas de origen humano en España. Años 2002 y 2003 (II). B. E. S. **13**: 85-8.
- Everest, P., J. Wain, M. Roberts, G. Rook y G. Dougan.** 2001. The molecular mechanisms of severe typhoid fever. Trends Microbiol. **9**: 316-20.
- Fierer J. y D. G. Guiney.** 2001. Diverse virulence traits underlying different clinical outcomes of *Salmonella* infection. J. Clin. Invest. **107**: 775-80.
- Fluit, A. C. y F. J. Schmitz.** 2004. Resistance integrons and super-integrons. Clin. Microbiol. Infect. **10**: 272-88.
- Frana, T. S., S. A. Carlson y R. W. Griffith.** 2001. Relative distribution and conservation of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium phage type DT104. Appl. Environ. Microbiol. **67**: 445-8.
- French, G. L. e I. Phillips.** 1997. Resistance. En: Antibiotic and Chemotherapy. 7ª edición. F. O' Grady, H. P. Lambert, R. G. Finch y D. Greenwood (eds.). Ed. Churchill Livingstone, Londres. pp. 23-43.
- Frech, G. y S. Schwarz.** 1999. Plasmid-encoded tetracycline resistance in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars Choleraesuis and Typhimurium: identification of complete and truncated Tn1721 elements. FEMS Microbiol. Lett. **176**: 97-103.
- Frech, G. y S. Schwarz.** 2000. Molecular analysis of tetracycline resistance in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars Typhimurium, Enteritidis, Dublin, Choleraesuis, Hadar and Saintpaul: construction and application of specific gene probes. J. Appl. Microbiol. **89**: 633-41.

- Frech, G., C. Kehrenberg y S. Schwarz.** 2003. Resistance phenotypes and genotypes of multiresistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium var. Copenhagen isolates from animal sources. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**: 180-2.
- de Frutos, C., B. Martín, E. Ortiz, A. Herrero y C. Jiménez.** 2005a. Análisis de los serotipos de *Salmonella spp* aislados en el año 2001 por los laboratorios de Sanidad Animal en España. *B. E. S.* **13**: 121-2.
- de Frutos, C., E. Ortiz, A. Herrero, J. L. Ayala y B. Fernández.** 2005b. Análisis de los serotipos de *Salmonella spp.* aislados durante los años 2002, 2003 y 2004 por los laboratorios de Sanidad Animal en España. *B. E. S.* **13**: 133-5.
- Galán, J. E., C. Ginocchio y P. Costeas.** 1992. Molecular and functional characterization of the *Salmonella* invasion gene *invA*: homology of InvA to members of a new protein family. *J. Bacteriol.* **4**: 4338-49.
- García, F. J., N. Frías, C. de Frutos, B. Martín y C. López.** 2001. Análisis de los serotipos de *Salmonella spp* aislados en el año 2000 por los laboratorios de Sanidad Animal en España. *B. E. S.* **9**: 287-8.
- Garrity, G. M., J. A. Bell y T. G. Lilburn.** 2004. Taxonomic outline of Prokariotes Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2ª Edición. Release 5.0., Springer-Verlag, New York. pp: 79-122.
- Gebreyes, W. A. y S. Thakur.** 2005. Multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Muenchen from pigs and humans and potential interserovar transfer of antimicrobial resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**: 503-11.
- Ginocchio, C., J. Pace y J. E. Galan.** 1992. Identification and molecular characterization of a *Salmonella* Typhimurium gene involved in triggering the internalization of salmonellae into cultured epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**: 5976-80.
- Gledel, J.** 1995. En: *Microbiología Alimentaria*. C. M. Bourgeois, J. F. Mescle y J. Zucca (eds.). Ed. Acribia, Zaragoza. pp. 53-66.
- Goldberg, M. B. y R. H. Rubin.** 1988. The spectrum of *Salmonella* infection. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **2**: 571-98.
- González-Hevia, M. A. y M. C. Mendoza.** 1995a. Differentiation of strains from a food-borne outbreak of *Salmonella enterica* by phenotypic and genetic typing methods. *Eur. J. Epidemiol.* **11**: 479-82.
- González-Hevia, M. A. y M. C. Mendoza.** 1995b. Polymorphism of rRNA genes and plasmid analysis in the typing of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis from a Spanish health area. *Microbiologica.* **18**: 377-384.

- González-Hevia, M. A., M. C. Martín, M. J. Lobato, M. F. Gutierrez, P. Solano y J. A. Alvarez-Riesgo.** 1999. *Salmonella enterica* y salmonelosis en el Principado de Asturias durante un período de siete años (1990-1996). *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **17**: 166-70.
- Gottesman S. y K. Abremski.** 1980. The role of HimA and Xis in lambda site-specific recombination. *J. Mol. Biol.* **138**: 503-12.
- Graeber, I., M. A. Montenegro, C. Bunge, U. Boettcher, H. Tobias, E. A. Heinemeyer y R. Helmuth.** 1995. Molecular marker analysis of *Salmonella* Typhimurium from surface waters, humans, and animals. *Eur. J. Epidemiol.* **11**: 325-31.
- Groisman, E. A.** 1998. The ins and outs of virulence gene expression: Mg²⁺ as a regulatory signal. *Bioessays.* **20**: 96-101.
- Guerra, B., S. M. Soto, S. Cal y M. C. Mendoza.** 2000a. Antimicrobial resistance and spread of class 1 integrons among *Salmonella* serotypes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 2166-9.
- Guerra, B., I. Laconcha, S. M. Soto, M. A. Gonzalez-Hevia y M. C. Mendoza.** 2000b. Molecular characterisation of emergent multiresistant *Salmonella enterica* serotype [4,5,12:i:-] organisms causing human salmonellosis. *FEMS Microbiol. Lett.* **190**: 341-7.
- Guerra, B., S. M. Soto, J. M. Arguelles y M. C. Mendoza.** 2001. Multidrug resistance is mediated by large plasmids carrying a class 1 integron in the emergent *Salmonella enterica* serotype [4,5,12:i:-]. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**: 1305-8.
- Guerra, B., S. Soto, R. Helmuth y M. C. Mendoza.** 2002. Characterization of a self-transferable plasmid from *Salmonella enterica* serotype Typhimurium clinical isolates carrying two integron-borne gene cassettes together with virulence and drug resistance genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**: 2977-81.
- Guerra, B., B. Malorny, A. Schroeter y R. Helmuth.** 2003. Multiple resistance mechanisms in fluoroquinolone-resistant *Salmonella* isolates from Germany. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**: 2059.
- Guerra, B., E. Junker, A. Miko, R. Helmuth y M. C. Mendoza.** 2004a. Characterization and localization of drug resistance determinants in multidrug-resistant, integron-carrying *Salmonella enterica* serotype Typhimurium strains. *Microb. Drug Resist.* **10**: 83-91.
- Guerra, B., E. Junker y R. Helmuth.** 2004b. Incidence of the recently described sulfonamide resistance gene *sul3* among German *Salmonella enterica* strains isolated from livestock and food. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**: 2712–2715.
- Hansson, K., L. Sundström, A. Pelletier y P. H. Roy.** 2002. IntI2 Integron Integrase in Tn7. *J. Bacteriol.* **184**: 1712-21.

- Hapfelmeier, S. y W. D. Hardt.** 2005. A mouse model for *S. Typhimurium*-induced enterocolitis. Trends Microbiol. **13**: 497-503.
- Hardt, W. D., L. M. Chen, K. E. Schuebel, X. R. Bustelo y J. E. Galan.** 1998. *S. Typhimurium* encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells. Cell. **93**: 815-26.
- Hartman, A. B., I. I. Essiet, D. W. Isenbarger y L. E. Lindler.** 2003. Epidemiology of tetracycline resistance determinants in *Shigella spp.* and enteroinvasive *Escherichia coli*: characterization and dissemination of *tet(A)-I*. J. Clin. Microbiol. **41**: 1023-32.
- Helmuth, R. y A. Hensel.** 2004. Towards the rational use of antibiotics: results of the first International Symposium on the Risk Analysis of Antibiotic Resistance. J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health. **51**: 357-60.
- Hensel, M., A. P. Hinsley, T. Nikolaus, G. Sawers y B. C. Berks.** 1999. The genetic basis of tetrathionate respiration in *Salmonella Typhimurium*. Mol. Microbiol. **32**: 275-87.
- Hensel, M.** 2004. Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. Int. J. Med. Microbiol. **294**: 95-102.
- Herrera-Leon, S.** 2004. Serotipificación molecular de *Salmonella* vs. Serotipificación tradicional. Análisis molecular de los genes *fliC* y *fliB* que codifican antígenos flagelares de primera y segunda fase y de genes serogrupo específicos del cluster *rfb*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid.
- Herrera-Leon, S., J. R. McQuiston, M. A. Usera, P. I. Fields, J. Garaizar y M. A. Echeita.** 2004. Multiplex PCR for distinguishing the most common phase-1 flagellar antigens of *Salmonella spp.* J. Clin. Microbiol. **42**: 2581-6.
- Herrera-Leon, S., R. Ramiro, M. Arroyo, R. Diez, M. A. Usera y M. A. Echeita.** 2006. Blind comparison of traditional serotyping with three multiplex PCRs for the identification of *Salmonella* serotypes. Res. Microbiol. **158**: 122-7.
- Herrero, A., M. R. Rodicio, M. A. González-Hevia y M. C. Mendoza.** 2006. Molecular epidemiology of emergent multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium strains carrying the virulence resistance plasmid pUO-StVR2. J. Antimicrob. Chemoth. **57**: 39-45.
- Hohmann, E. L.** 2001. Nontyphoidal salmonellosis. Clin. Infect. Dis. **32**: 263-9.
- Humphries, A. D., M. Raffatellu, S. Winter, E. H. Weening, R. A. Kingsley, R. Droleskey, S. Zhang, J. Figueiredo, S. Khare, J. Nunes, L. G. Adams, R. M. Tsolis y A. J. Bäumlner.** 2003. The use of flow cytometry to detect expression of subunits encoded by 11 *Salmonella enterica* serotype Typhimurium fimbrial operons. Mol. Microbiol. **48**: 1357-76.

- Hunter, S. B., P. Vauterin, M. A. Lambert-Fair, M. S. Van Duyn, K. Kubota, L. Graves, D. Wrigley, T. Barrett y E. Ribot.** 2005. Establishment of a universal size standard strain for use with the PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocols: converting the national databases to the new size standard. *J. Clin. Microbiol.* **43**: 1045-50.
- Jones, G. W., D. K. Rabert, D. M. Svinarich y H. J. Whitfield.** 1982. Association of adhesive, invasive, and virulent phenotypes of *Salmonella* Typhimurium with autonomous 60-megadalton plasmids. *Infect. Immun.* **38**: 476-86.
- Jones, B. D. y S. Falkow.** 1994. Identification and characterization of a *Salmonella* Typhimurium oxygen-regulated gene required for bacterial internalization. *Infect. Immun.* **62**: 3745-52.
- Jones, B. D. y S. Falkow.** 1996. Salmonellosis: host immune responses and bacterial virulence determinants. *Annu. Rev. Immunol.* **14**: 533-61.
- Kingsley, R. A., E. H. Weening, A. M. Keestra y A. J. Bäuml.** 2002. Population heterogeneity of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium resulting from phase variation of the *lpf* operon in vitro and in vivo. *J. Bacteriol.* **184**: 2352-9.
- Kleckner, N.** 1981. Transposable elements in prokaryotes. *Annu Rev. Genet.* **15**: 341-404.
- Knodler, L. A., J. Celli, W. D. Hardt, B. A. Vallance, C. Yip y B. B. Finlay.** 2002. *Salmonella* effectors within a single pathogenicity island are differentially expressed and translocated by separate type III secretion systems. *Mol. Microbiol.* **43**: 1089-103.
- Koort, J. M., S. Lukinmaa, M. Rantala, E. Unkila y A. Siitonen.** 2002. Technical improvement to prevent DNA degradation of enteric pathogens in Pulsed-Field Gel Electroforesis. *J. Clin. Microbiol.* **40**: 3497-8.
- Kopecko, D. J., J. Brevet y S. N. Cohen.** 1976. Involvement of multiple translocating DNA segments and recombinational hotspots in the structural evolution of bacterial plasmids. *J. Mol. Biol.* **108**: 333-60.
- Kuhle, V. y M. Hensel.** 2004. Cellular microbiology of intracellular *Salmonella enterica*: functions of the type III secretion system encoded by *Salmonella* pathogenicity island 2. *Cell Mol. Life Sci.* **61**: 2812-26.
- Landeras, E. y M. C. Mendoza.** 1998. Evaluation of PCR-based methods and ribotyping performed with a mixture of *PstI* and *SphI* to differentiate strains of *Salmonella* serotype Enteritidis. *J. Med. Microbiol.* **47**: 427-34.
- Lenglet, A.** 2005. Over 2000 cases so far in *S. Hadar* in Spain associated with consumption of pre-cooker chicken, July-August 2005. *Euro surviell.* **10**.

- Lester, A., N. H. Eriksen, H. Nielsen, P. B. Nielsen, A. Friis-Moller, B. Bruun, J. Scheibel, K. Gaarslev y H. J. Kolmos.** 1991. Non-typhoid *Salmonella* bacteraemia in Greater Copenhagen 1984 to 1988. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **10**: 486-90.
- Levesque, C., L. Piche, C. Larose y P. H. Roy.** 1995. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**: 185-91.
- Libby, S. J., W. Goebel, A. Ludwig, N. Buchmeier, F. Bowe, F. C. Fang, D. G. Guiney, J. G. Songer y F. Heffron.** 1994. A cytolysin encoded by *Salmonella* is required for survival within macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**: 489-93.
- Liebana, E., C. Clouting, C. A. Cassar, L. P. Randall, R. A. Walker, E. J. Threlfall, F. A. Clifton-Hadley, A. M. Ridley y R. H. Davies.** 2002. Comparison of *gyrA* mutations, cyclohexane resistance, and the presence of class I integrons in *Salmonella enterica* from farm animals in England and Wales. *J. Clin. Microbiol.* **40**: 1481-6.
- Liebert, C. A., R. M. Hall y A. O. Summers.** 1999. Transposon Tn21, flagship of the floating genome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**: 507-22.
- Lin, A. W., M. A. Usera, T. J. Barrett y R. A. Goldsby.** 1996. Application of random amplified polymorphic DNA analysis to differentiate strains of *Salmonella* Enteritidis. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 870-6.
- Lindstedt, B. A., E. Heir, I. Nygard y G. Kapperud.** 2003. Characterization of class I integrons in clinical strains of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars Typhimurium and Enteritidis from Norwegian hospitals. *J. Med. Microbiol.* **52**: 141-9.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko y J. Parker.** 1998a. En: Brock Biología de los microorganismos. 8ª edición. Ed. Prentice Hall Iberia, Madrid. pp: 343.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko y J. Parker.** 1998b. En: Brock Biología de los microorganismos. 8ª edición. Ed. Prentice Hall Iberia, Madrid. pp: 807
- Madsen, L., F. M. Aarestrup y J. E. Olsen.** 2000. Characterisation of streptomycin resistance determinants in Danish isolates of *Salmonella* Typhimurium. *Vet. Microbiol.* **75**: 73-82.
- Malorny, B., A. Schroeter, B. Guerra y R. Helmuth.** 2003. Incidence of quinolone resistance in strains of *Salmonella* isolated from poultry, cattle and pigs in Germany between 1998 and 2001. *Vet. Rec.* **153**: 643-8.
- Marcus, S. L., J. H. Brumell, C. G. Pfeifer y B. B. Finlay.** 2000. *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes Infect.* **2**: 145-56.
- Marshall, D. G., B. J. Sheehan y C. J. Dorman.** 1999. A role for the leucine-responsive regulatory protein and integration host factor in the regulation of the *Salmonella* plasmid virulence (*spv*) locus in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* **34**: 134-45.

- Martín, M. C., M. A. González-Hevia, I. Moro y M. C. Mendoza.** 1997. Genetic typing methods applied to the differentiation of clonal lines among *Salmonella enterica* serogroup G strains causing human salmonellosis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **19**: 215-21.
- Martín, M. C., M. A. González-Hevia, J. A. Álvarez-Riesgo y M. C. Mendoza.** 2001. *Salmonella* serotype Virchow causing salmonellosis in a Spanish region. Characterization and survey of clones by DNA fingerprinting, phage typing and antimicrobial resistance. *Eur. J. Epidemiol.* **17**: 31-40.
- Martínez, N., M. C. Mendoza, B. Guerra, M. A. González-Hevia y M. R. Rodicio.** 2005. Genetic basis of antimicrobial drug resistance in clinical isolates of *Salmonella enterica* serotype Hadar from a Spanish region. *Microb. Drug Resist.* **11**: 185-93.
- McClelland, M., K. E. Sanderson, J. Spieth, S. W. Clifton, P. Latreille, L. Courtney, S. Porwollik, J. Ali, M. Dante, F. Du, S. Hou, D. Layman, S. Leonard, C. Nguyen, K. Scott, A. Holmes, N. Grewal, E. Mulvaney, E. Ryan, H. Sun, L. Florea, W. Miller, T. Stoneking, M. Nhan, R. Waterston y R. K. Wilson.** 2001. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature.* **413**: 852-6.
- Meunier, D., D. Boyd, M. R. Mulvey, S. Baucheron, C. Mammina, A. Nastasi, E. Chaslus-Dancla y A. Cloeckaert.** 2002. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT 104 antibiotic resistance genomic island I in serotype Paratyphi B. *Emerg. Infect. Dis.* **8**: 430-3.
- Meunier, D., S. Baucheron, E. Chaslus-Dancla, J. L. Martel y A. Cloeckaert.** 2003. Florfenicol resistance in *Salmonella enterica* serovar Newport mediated by a plasmid related to R55 from *Klebsiella pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**: 1007-9.
- Michael, G. B., P. Butaye, A. Cloeckaert y S. Schwarz.** 2006. Genes and mutations conferring antimicrobial resistance in *Salmonella*: an update. *Microbes Infect.* **8**: 1898-914.
- Miko, A., K. Pries, A. Schroeter y R. Helmuth.** 2003. Multiple-drug resistance in D-tartrate-positive *Salmonella enterica* serovar Paratyphi B isolates from poultry is mediated by class 2 integrons inserted into the bacterial chromosome. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**: 3640-3.
- Miko, A., K. Pries, A. Schroeter y R. Helmuth.** 2005. Molecular mechanisms of resistance in multidrug-resistant serovars of *Salmonella enterica* isolated from foods in Germany. *J. Antimicrob. Agents.* **56**: 1025-33.
- Millemann, Y., M. C. Lesage, E. Chaslus-Dancla y J. P. Lafont.** 1995. Value of plasmid profiling, ribotyping, and detection of IS200 for tracing avian isolates of *Salmonella* Typhimurium and *S. Enteritidis*. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 173-9.

- Miller, S. I.** 1991. PhoP/PhoQ: macrophage-specific modulators of *Salmonella* virulence? *Mol. Microbiol.* **5**: 2073-2078.
- Miller, S. I. y D. A. Pegues.** 2000. *Salmonella* species, including *Salmonella* Typhi. En: Principles and Practice of infectious diseases. Mandell, Douglas y Bennett (eds.). 5º edición. Ed. Churchill Livingstone, Filadelfia. pp. 2345-62.
- Miriagou, V., L. S. Tzouveleki, S. Rossiter, E. Tzelepi, F. J. Angulo y J. M. Whichard.** 2003. Imipenem resistance in a *Salmonella* clinical strain due to plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**: 1297-300.
- Miriagou, V., A. Carattoli y S. Fanning.** 2006. Antimicrobial resistance islands: resistance gene clusters in *Salmonella* chromosome and plasmids. *Microbes Infect.* **8**: 1923-30.
- Mims, C. A., J. H. L. Playfair., I. M. Roitt. y R. Williams.** 1995. En: Microbiología Médica. 1ª edición. Ed. Mosby/Doyma, Madrid. pp. 25.1-25.30.
- Moncrief, M. B. y M. E. Maguire.** 1999. Magnesium transport in prokaryotes. *J. Biol. Inorg. Chem.* **4**: 523-7.
- Morpeth, S. C. y N. M. Thielman.** 2006. Diarrhea in patients with AIDS. *Curr. Treat. Options Gastroenterol.* **9**: 23-37.
- Morscheck, C., D. Langendorfer y J. M. Schierholz.** 2004. A quantitative real-time PCR assay for the detection of *tetR* of Tn10 in *Escherichia coli* using SYBR Green and the Opticon. *J. Biochem. Biophys. Methods.* **59**: 217-27.
- Mossel, D. A., B. Moreno y C. B. Struijk.** 2002. En: Microbiología de los alimentos. 2ª edición. Ed. Acribia, Zaragoza.
- Mulvey, M. R., D. A. Boyd, A. B. Olson, B. Doublet y A. Cloeckaert.** 2006. The genetics of *Salmonella* genomic island 1. *Microbes Infect.* **8**: 1915-22.
- Nastasi, A. y C. Mamma.** 2001. Presence of class I integrons in multidrug-resistant, low-prevalence *Salmonella* serotypes, Italy. *Emerg. Infect. Dis.* **7**: 455-8.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 2005. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing-Fifteenth Informational Supplement, Approved Standard M100-S15. NCCLS, Wayne, PA, USA.
- Ng, L. K., M. R. Mulvey, I. Martin, G. A. Peters y W. Johnson.** 1999. Genetic characterization of antimicrobial resistance in Canadian isolates of *Salmonella* serovar Typhimurium DT104. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**: 3018-21.
- Nógrády, N., I. Gadó, A. Tóth y J. Paszti.** 2005. Antibiotic resistance and class 1 integron patterns of non-typhoidal human *Salmonella* serotypes isolated in Hungary in 2002 and 2003. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **26**: 126-32.

- Norris, F. A., M. P. Wilson, T. S. Wallis, E. E. Galyov y P. W. Majerus.** 1998. SopB, a protein required for virulence of *Salmonella* Dublin, is an inositol phosphate phosphatase. Proc. Natl. Acad. Sci. **95**: 14057-9.
- Orman, B. E., S. A. Pineiro, S. Arduino, M. Galas, R. Melano, M. I. Caffer, D. O. Sordelli y D. Centron.** 2002. Evolution of multiresistance in nontyphoid *Salmonella* serovars from 1984 to 1998 in Argentina. Antimicrob. Agents Chemother. **46**: 3963-70.
- Pai, H., J. H. Byeon, S. Yu, B. K. Lee y S. Kim.** 2003. *Salmonella enterica* serovar Typhi strains isolated in Korea containing a multidrug resistance class 1 integron. Antimicrob. Agents Chemother. **47**: 2006-8.
- Paiva de Sousa, C. y J. D. Dubreuil.** 2001. Distribution and expression of the *astA* gene (EAST1 toxin) in *Escherichia coli* and *Salmonella*. Int. J. Med. Microbiol. **291**: 15-20.
- Parkhill, J., G. Dougan, K. D. James, N. R. Thomson, D. Pickard, J. Wain, C. Churcher, K. L. Mungall, S. D. Bentley, M. T. Holden, M. Sebaihia, S. Baker, D. Basham, K. Brooks, T. Chillingworth, P. Connerton, A. Cronin, P. Davis, R. M. Davies, L. Dowd, N. White, J. Farrar, T. Feltwell, N. Hamlin, A. Haque, T. T. Hien, S. Holroyd, K. Jagels, A. Krogh, T. S. Larsen, S. Leather, S. Moule, P. O'Gaora, C. Parry, M. Quail, K. Rutherford, M. Simmonds, J. Skelton, K. Stevens, S. Whitehead y B. G. Barrell.** 2001. Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. Nature. **413**: 848-52.
- Partridge, S. R. y R. M. Hall.** 2004. Complex multiple antibiotic and mercury resistance region derived from the r-det of NR1 (R100). Antimicrob. Agents Chemother. **48**: 4250-5.
- Pasmans, F., F. Van Immerseel, M. Heyndrickx, A. Martel, C. Godard, C. Wildemaue, R. Ducatelle y F. Haesebrouck.** 2003. Host adaptation of pigeon isolates of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium variant Copenhagen phage type 99 is associated with enhanced macrophage cytotoxicity. Infect. Immun. **71**: 6068-74.
- Pasquali, F., C. Kehrenberg, G. Manfreda y S. Schwarz.** 2005. Physical linkage of Tn3 and part of Tn1721 in a tetracycline and ampicillin resistance plasmid from *Salmonella* Typhimurium. J. Antimicrob. Chemother. **55**: 562-5.
- Paulsen, I. T.** 2003. Multidrug efflux pumps and resistance: regulation and evolution. Curr. Opin. Microbiol. **6**: 446-51.
- Perez-Moreno, M. O., M. Carulla-Pont, M. Perez-Moreno, A. M. Jardi-Baiges, M. I. Llovet-Lombarte, X. Tejedor-Ganduxe y J. Zaragoza-Lopez.** 2005. Integrones de clase 1 en aislamientos de *Salmonella enterica* productores de diferentes tipos de beta-lactamasas recogidos en la región sanitaria de Tortosa. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. **23**: 259-65.

- Perreten, V. y P. Boerlin.** 2003. A new sulfonamide resistance gene (*sul3*) in *Escherichia coli* is widespread in the pig population of Switzerland. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**: 1169-72.
- Peters, T. M., C. Maguire, E. J. Threlfall, I. S. Fisher, N. Gill y A. J. Gatto.** 2003. Salm-gene project. The Salm-gene project - a European collaboration for DNA fingerprinting for food-related salmonellosis. *Euro Surveill.* **8**: 46-50.
- Petska, J. J. y M. F. Witt.** 1985. An overview of immune function. *Food Technol.* **39**: 83-90.
- Pezzella, C., A. Ricci, E. DiGiannatale, I. Luzzi y A. Carattoli.** 2004. Tetracycline and streptomycin resistance genes, transposons, and plasmids in *Salmonella enterica* isolates from animals in Italy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**: 903-8.
- Politi, L., P. T. Tassios, M. Lambiri, A. Kansouzidou, M. Pasiotou, A. C. Vatopoulos, K. Mellou, N. J. Legakis y L. S. Tzouvelekis.** 2005. Repeated occurrence of diverse extended-spectrum beta-lactamases in minor serotypes of food-borne *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. *J. Clin. Microbiol.* **43**: 3453-6.
- Prager, R., A. Fruth y H. Tschape.** 1995. *Salmonella* enterotoxin (*stn*) gene is prevalent among strains of *Salmonella enterica*, but not among *Salmonella bongori* and other Enterobacteriaceae. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **12**: 47-50.
- Prescott, L., J. P. Harley y D. A. Klein.** 2004. En: *Microbiologia*. 5ª edición. Ed. McGraw Hill, Madrid. pp. 62-63.
- Raffatellu, M., D. Chessa, R. P. Wilson, C. Tukel, M. Akcelik y A.J. Bäumlér.** 2006. Capsule-mediated immune evasion: a new hypothesis explaining aspects of typhoid fever pathogenesis. *Infect. Immun.* **74**: 19-27.
- Rahman, H.** 2006. Prevalence and phenotypic expression of *sopB* gene among clinical isolates of *Salmonella enterica*. *Indian J. Med. Res.* **123**: 83-8.
- Randall, L. P., S. W. Cooles, M. K. Osborn, L. J. Piddock y M. J. Woodward.** 2004. Antibiotic resistance genes, integrons and multiple antibiotic resistance in thirty-five serotypes of *Salmonella enterica* isolated from humans and animals in the UK. *J. Antimicrob. Chemother.* **53**: 208-16.
- Recchia G. D. y R. M. Hall.** 1995. Gene cassettes: a new class of mobile element. *Microbiology.* **141**: 3015-27.
- Reeves, M. W., G. M. Evins, A. A. Heiba, B. D. Plikaytis y J. J. Farmer III.** 1989. Clonal nature of *Salmonella* Thyphi and its genetic relatedness to other Salmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori* comb. Nov. *J. Clin. Microbiol.* **27**: 313-320.

- Relman, D. A. y S. Falkow.** 1997. En: Enfermedades infecciosas. Principios y Práctica. 4ª edición. G. L. Mandell, J. E. Bennet y R. Dolin (eds.). Ed. Panamericana, Buenos Aires. pp. 21-9.
- Rodríguez, I., M. R. Rodicio, M. C. Mendoza y M. C. Martín.** 2006a. Large conjugative plasmids from clinical strains of *Salmonella enterica* serovar Virchow contain a class 2 integron in addition to class 1 integrons and several non-integron-associated drug resistance determinants. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**: 1603-7.
- Rodríguez, I., M. C. Martín, M. C. Mendoza y M. R. Rodicio.** 2006b. Class 1 and class 2 integrons in non-prevalent serovars of *Salmonella enterica*: structure and association with transposons and plasmids. *J. Antimicrob. Chemother.* **58**: 1124-32.
- Rodríguez, I., A. Herrero, N. Martínez, M. C. Martín, M. R. Rodicio y M. C. Mendoza.** 2006c. Detection and characterization of integrons, transposons, plasmids and genomic types in multidrug resistant clinical isolates of *Salmonella enterica* serovar Virchow. En: "Modern Multidisciplinary Applied Microbiology: Exploiting Microbes and their Interactions". Méndez Vilas (ed.). Ed. Wiley-VCH, Alemania. pp. 687-91.
- Rodríguez, M., I. De Diego, y M. C. Mendoza.** 1998. Extra-intestinal salmonellosis in a general hospital (1991-96). Relationships between *Salmonella* genomic groups and clinical forms. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 3291-6.
- Rodríguez, M., I. de Diego, N. Martínez, M. R. Rodicio y M. C. Mendoza.** 2006d. Nontyphoidal *Salmonella* causing focal infections in patients admitted at a Spanish general hospital during an 11-year period (1991-2001). *Int. J. Med. Microbiol.* **296**: 211-22.
- Romling, U., W. D. Sierralta, K. Eriksson y S. Normark.** 1998. Multicellular and aggregative behaviour of *Salmonella* Typhimurium strains is controlled by mutations in the *agfD* promoter. *Mol. Microbiol.* **28**: 249-64.
- Rotger, R. y J. Casadesus.** 1999. The virulence plasmids of *Salmonella*. *Int. Microbiol.* **2**: 177-84.
- Rowe-Magnus, D. A., A. M. Guerout, P. Ploncard, B. Dychinco, J. Davies y D. Mazel.** 2001. The evolutionary history of chromosomal super-integrons provides an ancestry for multiresistant integrons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **98**: 652-7.
- Rowe-Magnus, D. A. y D. Mazel.** 2002. The role of integrons in antibiotic resistance gene capture. *Int. J. Med. Microbiol.* **292**: 115-25.
- Rowe-Magnus, D. A., A. M. Guerout y D. Mazel.** 2002. Bacterial resistance evolution by recruitment of super-integron gene cassettes. *Mol. Microbiol.* **43**: 1657-69.
- Ruiz, M., J. C. Rodríguez, M. Elia y G. Royo.** 2000. Infecciones extraintestinales producidas por serotipos no tifoideos de *Salmonella*. Experiencia de nueve años. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **18**: 219-22.

- Sambrock, J. y D. W. Russel.** 2001. Molecular cloning: A Laboratory Manual. 3ª edición. Cold Spring Harbor Laboratory, New York..
- Sandvang, D., F. M. Aarestrup y L. B. Jensen.** 1997. Characterisation of integrons and antibiotic resistance genes in Danish multiresistant *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. FEMS Microbiol. Lett. **157**: 177-81.
- Sanger, F., S. Nicklen y A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. **74**: 5463-7.
- Sansonetti, P.** 2002. Host-pathogen interactions: the seduction of molecular cross talk. Gut. **50**: III2-8.
- Savarino, S. J., A. Fasano, J. Watson, B. M. Martin, M. M. Levine, S. Guandalini y P. Guerry.** 1993. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. Proc. Natl. Acad. Sci. **90**: 3093-7.
- Schnabel, E. L. y A. L. Jones.** 1999. Distribution of tetracycline resistance genes and transposons among Phylloplane Bacteria in Michigan apple orchards. Appl. Environ. Microbiol. **65**: 4898-907.
- Schmidt, H. y M. Hensel.** 2004. Pathogenicity Islands in Bacterial Pathogenesis. Clin. Microbiol. Rev. **17**: 14-56.
- Shanahan, P. M., K. A. Karamat, C. J. Thomson y S. G. Amyes.** 2000. Characterization of multi-drug resistant *Salmonella* Typhi isolated from Pakistan. Epidemiol. Infect. **124**: 9-16.
- Singh, A., R. V. Goering, S. Simjee, S. L. Foley y M. J. Zervos.** 2006. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. Clin. Microbiol. Rev. **19**: 512-30.
- Soto, S. M., B. Guerra, M. A. González-Hevia y M. C. Mendoza.** 1999. Potential of three-way randomly amplified polymorphic DNA analysis as a typing method for twelve *Salmonella* serotypes. Appl. Environ. Microbiol. **65**: 4830-6.
- Soto, S. M., N. Martinez, B. Guerra, M. A. González-Hevia y M. C. Mendoza.** 2000. Usefulness of genetic typing methods to trace epidemiologically *Salmonella* serotype Ohio. Epidemiol. Infect. **125**: 481-9.
- Soto, S. M., B. Guerra, A. del Cerro, M. A. Gonzalez-Hevia y M. C. Mendoza.** 2001. Outbreaks and sporadic cases of *Salmonella* serovar Panama studied by DNA fingerprinting and antimicrobial resistance. Int. J. Food Microbiol. **71**: 35-43.
- Soto, S. M., M. A. Gonzalez-Hevia y M. C. Mendoza.** 2003a. Antimicrobial resistance in clinical isolates of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis: relationships between mutations conferring quinolone resistance, integrons, plasmids and genetic types. J. Antimicrob. Chemother. **51**: 1287-91.

- Soto, S. M., M. C. Martín y M. C. Mendoza.** 2003b. Distinctive human and swine strains of *Salmonella enterica* serotype Wien carry large self-transferable R-plasmids. A plasmid contains a class 1-*qacEΔ1-sul1* integron with the *dfrA1-aadA1a* cassette configuration. Food Microbiol. **20**: 9-16.
- Soto, S. M., I. Rodríguez, M. R. Rodicio, J. Vila y M. C. Mendoza.** 2006. Detection of virulence determinants in clinical strains of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis and mapping on macrorestriction profiles. J. Med. Microbiol. **55**: 365-73.
- Stone G. G., R. D. Oberst, M. P. Hays, S. McVey y M. M. Chengappa.** 1994. Detection of *Salmonella* serovars from clinical samples by enrichment broth cultivation-PCR procedure. J. Clin. Microbiol. **32**: 1742-9.
- Streckel, W., A. C. Wolff, R. Prager, E. Tietze y H. Tschape.** 2004. Expression profiles of effector proteins SopB, SopD1, SopE1, and AvrA differ with systemic, enteric, and epidemic strains of *Salmonella enterica*. Mol. Nutr. Food Res. **48**: 496-503.
- Struelens, M. J.** 1996. Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. Clin. Microbiol. Infect. **2**: 2-11.
- Tenover, F. C., R. D. Arbeit, R. V. Goering, P. A. Mickelsen, B. E. Murray, D. H. Persing, y B. Swaminathan.** 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J. Clin. Microbiol. **33**: 2233-9.
- Threlfall, E. J., L. R. Ward y B. Rowe.** 1999. Resistance to ciprofloxacin in non-typhoidal salmonellas from humans in England and Wales-the current situation. Clin. Microbiol. Infect. **5**: 130-4.
- Threlfall, E. J.** 2000. Epidemic *Salmonella* Typhimurium DT 104-a truly international multiresistant clone. J. Antimicrob. Chemother. **46**: 7-10.
- Threlfall, E. J.** 2002. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: problems and perspectives in food- and water-borne infections. FEMS Microbiol. Rev. **26**: 141-8.
- Threlfall, E. J., I. S. Fisher, C. Berghold, P. Gerner-Smidt, H. Tschape, M. Cormican, I. Luzzi, F. Schnieder, W. Wannet, J. Machado y G. Edwards.** 2003. Antimicrobial drug resistance in isolates of *Salmonella enterica* from cases of salmonellosis in humans in Europe in 2000: results of international multi-centre surveillance. Euro Surveill. **8**: 41-5.
- Threlfall, E. J, M. Day, E. de Pinna, H. Lewis y J. Lawrence.** 2006. Drug-resistant enteric fever in the UK. Lancet. **367**: 1576.
- Toleman, M. A., P. M. Bennett y T. R. Walsh.** 2006. ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century? Microbiol. Mol. Biol. Rev. **70**: 296-316.

- Tükel, Ç., M. Raffatellu, D. Chessa, R. P. Wilson, M. Akcelik y A. J. Bäumler.** 2006. Neutrophil influx during non-typhoidal salmonellosis: who is in the driver's seat? *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **46**: 320-9.
- Usera, M. A, R. Díez y A. Echeitia.** 1994. Análisis de los serotipos de *Salmonella sp.* aislados en España en el año 1993. *B. E.S.* **9**: 165-88.
- Usera, M. A, R. Díez y A. Echeitia.** 1995a. Análisis de los serotipos de *Salmonella sp.* aislados en España en el año 1994. *B. E. S.* **15**: 165-72.
- Usera, M. A., R. Cano y A. Echeita.** 1995b. Análisis de los serotipos de *Salmonella sp.* aislados en España en el período 1988-1992. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **13**: 138-45.
- Usera, M. A., R. Díez y A. Echeita.** 1996a. Análisis de los serotipos de *Salmonella sp.* aislados en España en el año 95. *B. E. S.* **4**: 121-8.
- Usera, M. A., A. Echeita, A. Aladueña, M. C. Blanco, R. Reymundo, M. I. Prieto, O. Tello, R. Cano, D. Herrera y F. Martínez-Navarro.** 1996b. Interregional foodborne salmonellosis outbreak due to powdered infant formula contaminated with lactose-fermenting *Salmonella* Virchow. *Eur. J. Epidemiol.* **12**: 377-81.
- Usera, M. A., A. Aladueña, R. Díez, M. de la Fuente y A. Echeita.** 1997a. Análisis de las cepas de *Salmonella sp.* aisladas de muestras clínicas de origen humano en España. Año 1996a. *B. E. S.* **3**: 21-8.
- Usera, M. A., A. Aladueña, R. Díez, P. Cerdán, R. Gutiérrez y A. Echeita.** 1997b. Análisis de los serotipos de *Salmonella sp.* aisladas de muestras no humanas en 1996 en España. *B. E. S.* **8**: 69-74.
- Usera, M. A., A. Aladueña, R. Díez, M. de la Fuente, R. Gutiérrez, P. Cerdán y A. Echeita.** 1998a. Análisis de las cepas de *Salmonella sp.* aisladas de muestras clínicas de origen humano en España en el año 1997. *B. E. S.* **13**: 129-36.
- Usera, M. A., A. Aladueña, R. Díez, M. de la Fuente, R. Gutiérrez, P. Cerdán y A. Echeita.** 1998b. Análisis de las cepas de *Salmonella sp.* aisladas de muestras de origen no humano en España en el año 1997. *B. E. S.* **14**: 137-48.
- Usera, M. A., A. Aladueña, R. Díez, M. de la Fuente, R. Gutiérrez, P. Cerdán, M. Arroyo, R. Gonzalez y A. Echeita.** 2001a. Análisis de las cepas de *Salmonella sp.* aisladas de muestras clínicas de origen humano en España en el año 2000. *B. E. S.* **9**: 221-4.
- Usera, M. A., A. Aladueña, R. Díez, M. de la Fuente, R. Gutiérrez, P. Cerdán, M. Arroyo, R. Gonzalez y A. Echeita.** 2001b. Análisis de las cepas de *Salmonella sp.* aisladas de muestras clínicas de origen humano en España en el año 2000 (II). *B. E. S.* **9**: 229-30.

- Usera, M. A., A. Aladueña, R. Díaz, M. de la Fuente, P. Cerdán, R. Gutiérrez y A. Echeita.** 2001c. Análisis de las cepas de *Salmonella spp* aisladas de muestras de origen no humano en España en el año 2000. B. E. S. **9**: 281-7.
- Usera, M. A., A. Aladueña, R. Diez, M. de La Fuente, R. Gutiérrez, P. Cerdán, M Arroyo, R González y A. Echeita.** 2003a. Análisis de las cepas de *Salmonella sp.* aisladas de muestras clínicas de origen humano en España. Año 2001 (I). B. E. S. **11**: 133-6.
- Usera, M. A., A. Aladueña, R. Diez, M. de La Fuente, R. Gutiérrez, P. Cerdán, M Arroyo, R González y A. Echeita.** 2003b. Análisis de las cepas de *Salmonella sp.* aisladas de muestras clínicas de origen humano en España. Año 2001 (II). B. E. S. **11**: 145-7.
- Valdezate, S., A. Echeita, R. Diez y M. A. Usera.** 2000. Evaluation of phenotypic and genotypic markers for characterisation of the emerging gastroenteritis pathogen *Salmonella* Hadar. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **19**: 275-81.
- Valdezate, S., M. Arroyo, R. González-Sanz, R. Diez, A. Aladueña, P. Cerdán, R. Gutierrez, M. de la Fuente, S. Herrera-León, M. A. Usera y A. Echeita.** 2003. Análisis de las cepas de *Salmonella spp* aisladas de muestras de origen no humano en España en el año 2002 (II). B. E. S. **11**: 229-32.
- van Asten, A. J. y J. E. van Dijk.** 2005. Distribution of "classic" virulence factors among *Salmonella spp*. FEMS Immunol. Med. Microbiol. **44**: 251-9.
- Vázquez, F., M. C. Mendoza, M. H. Villar, F. Pérez y F. J. Méndez.** 1994. Survey of bacteraemia in a spanish hospital over a decade (1981-1990). J. Hosp. Infect. **26**: 111-21.
- Vila, J., J. Ruiz, F. Marco, A. Barcelo, P. Goni, E. Giralt y T. Jimenez de Anta.** 1994. Association between double mutation in *gyrA* gene of ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* and MICs. Antimicrob. Agents Chemother. **38**: 2477-9.
- Vila, J., J. Ruiz, P. Goni, A. Marcos y T. Jimenez de Anta.** 1995. Mutation in the *gyrA* gene of quinolone-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob. Agents Chemother. **39**: 1201-3.
- Villa, L., C. Mamma, V. Miriagou, L. S. Tzouvelekis, P. T. Tassios, A. Nastasi y A. Carattoli.** 2002. Multidrug and broad-spectrum cephalosporin resistance among *Salmonella enterica* serotype Enteritidis clinical isolates in southern Italy. J. Clin. Microbiol. **40**: 2662-5.
- Villa, L. y A. Carattoli.** 2005. Integrons and transposons on the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium virulence plasmid. Antimicrob. Agents Chemother. **49**: 1194-7.
- Wallis, T. S. y E. E. Galyov.** 2000. Molecular basis of *Salmonella*-induced enteritis. Mol. Microbiol. **36**: 997-1005.

- Waterman, S. R. y D. W. Holden.** 2003. Functions and effectors of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system. *Cell Microbiol.* **5**: 501-11.
- Way, J. S., K. L. Josephson, S. D. Pillai, M. Abbaszadegan, C. P. Gerba e I. L. Pepper.** 1993. Specific detection of *Salmonella spp.* by multiplex polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1473-9.
- Weening, E. H., J. D. Barker, M. C. Laarakker, A. D. Humphries, R. M. Tsolis y A. J. Bäumler.** 2005. The *Salmonella enterica* serotype Typhimurium *lpf, bcf, stb, stc, std,* and *sth* fimbrial operons are required for intestinal persistence in mice. *Infect. Immun.* **73**: 3358-66.
- Weide-Botjes, M., B. Kobe, C. Lange y S. Schwarz.** 1998. Molecular typing of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Hadar: evaluation and application of different typing methods. *Vet. Microbiol.* **61**: 215-27.
- Williams, J. G., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski y S. V. Tingey.** 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* **18**: 6531-5.
- White, P. A., C. J. McIver y W. D. Rawlinson.** 2001. Integrons and gene cassettes in the enterobacteriaceae. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**: 2658-61.
- White, A. P., D. L. Gibson, S. K. Collinson, P. A. Banser y W. W. Kay.** 2003a. Extracellular polysaccharides associated with Thin Aggregative Fimbriae of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *J. Bacteriol.* **185**: 5398-407.
- White, D. G., A. Datta, P. McDermott, S. Friedman, S. Qaiyumi, S. Ayers, L. English, S. McDermott, D. D. Wagner, y S. Zhao.** 2003b. Antimicrobial susceptibility and genetic relatedness of *Salmonella* serovars isolated from animal-derived dog treats in the USA. *J. Antimicrob. Chemother.* **52**: 860-3.
- Wood, M. W., M. A. Jones, P. R. Watson, S. Hedges, T. S. Wallis y E. E. Galyov.** 1998. Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* enteropathogenicity. *Mol. Microbiol.* **29**: 883-891.
- Wright, J. M., M. Brett y J. Bennett.** 1998. Laboratory investigation and comparison of *Salmonella* Brandenburg cases in New Zealand. *Epidemiol. Infect.* **121**: 49-55.
- Wybot, I., C. Wildemaue, C. Godard, S. Bertrand y J. M. Collard.** 2004. Antimicrobial drug resistance in nontyphoid human *Salmonella* in Belgium: trends for the period 2000-2002. *Acta Clin. Belg.* **59**: 152-60.
- Yagupsky, P., N. Maimon y R. Dagan.** 2002. Increasing incidence of nontyphi *Salmonella* bacteremia among children living in southern Israel. *Int. J. Infect. Dis.* **6**: 94-7.

- Zhao, S., S. Qaiyumi, S. Friedman, R. Singh, S. L. Foley, D. G. White, P. F. McDermott, T. Donkar, C. Bolin, S. Munro, E. J. Baron y R. D. Walker.** 2003. Characterization of *Salmonella enterica* Serotype Newport Isolated from Humans and Food Animals. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 5366-71.
- Zhou, D. y J. Galan.** 2001. *Salmonella* entry into host cells: the work in concert of type III secreted effector proteins. *Microbes Infect.* **3**: 1293-8.

Anexos

Anexo I. Características epidemiológicas de los aislamientos de *Salmonella*

Tabla I.a. Serotipo Hadar

Nº ref.	DATOS DEL AISLAMIENTO			DATOS DEL PACIENTE			CATEGORÍA EPIDEMIOLÓGICA
	Aisl./AÑO	MES	ÁREA PA	MUESTRA	SEXO	EDAD (años)	CA/BROTE
H1	64/95	marzo	IV	heces	H	60	CA
H2	65/95	febrero	IV	heces	H	1	CA
H3	225/95	julio	V	heces	H	30	CA
H4	318/95	agosto	V	heces	H	43	CA
H5	336/95	agosto	V	heces	H	34	CA
H6	374/95	agosto	III	heces	H	58	CA
H7	389/95	agosto	V	heces	M	15	CA
H8	390/95	septiembre	V	heces	M	NC	1 BF/2
H9	391/95	septiembre	V	heces	H	NC	1 BF/2
H10	501/95	noviembre	V	heces	M	28	CA
H11	505/95	noviembre	V	heces	H	4	CA
H12	562/95	diciembre	V	heces	H	PD	CA
H13	578/95	diciembre	V	heces	M	53	CA
H14	40/96	febrero	VIII	heces	H	NC	CA
H15	175/96	junio	V	heces	H	21	CA
H16	224/96	julio	V	heces	H	1	CA
H17	248/96	julio	V	heces	H	NC	CA
H18	250/96	julio	V	heces	M	3	CA
H19	310/96	agosto	III	heces	M	NC	CA
H20	444/96	octubre	V	heces	M	NC	CA
H21	542/96	diciembre	III	heces	H	0,6	CA
H22	543/96	diciembre	III	heces	M	3	CA
H23	9/97	enero	V	heces	H	NC	CA
H24	12/97	febrero	II	heces	M	3	CA
H25	28/97	marzo	V	heces	H	7	CA
H26	153/97	septiembre	III	heces	M	5	CA
H27	282/97	septiembre	V	heces	M	8	CA
H28	295/97	septiembre	V	heces	H	NC	CA
H29	334/97	octubre	II	heces	H	11	CA
H30	343/97	octubre	V	heces	H	69	CA
H31	414/97	noviembre	IV	heces	M	65	CA
H32	23/98	enero	V	heces	M	0,4	CA
H33	113/98	abril	IV	heces	H	52	CA
H34	156/98	mayo	III	heces	H	42	CA
H35	175/98	junio	III	heces	H	48	CA
H36	186/98	junio	III	heces	H	49	CA
H37	217/98	julio	V	heces	M	1	CA
H38	247/98	julio	IV	heces	H	41	CA
H39	281/98	agosto	V	heces	M	2	CA
H40	369/98	agosto	V	heces	M	28	CA
H41	419/98	septiembre	II	heces	H	69	CA
H42	448/98	octubre	V	heces	H	12	CA

Tabla I.a. Serotipo Hadar (continuación)

Nº ref.	DATOS DEL AISLAMIENTO			DATOS DEL PACIENTE			CATEGORÍA EPIDEMIOLÓGICA
	Aisl./AÑO	MES	ÁREA PA	MUESTRA	SEXO	EDAD (años)	CA/BROTE
H43	509/98	noviembre	II	heces	H	NC	CA
H44	515/98	noviembre	III	orina	M	18	CA
H45	522/98	noviembre	V	heces	H	13	CA
H46	543/98	diciembre	V	heces	M	28	CA
H47	15/99	enero	IV	heces	M	75	CA
H48	25/99	febrero	III	heces	H	1	CA
H49	27/99	febrero	II	heces	H	NC	CA
H50	32/99	febrero	V	heces	M	9	CA
H51	44/99	marzo	IV	heces	H	2	CA
H52	58/99	marzo	V	heces	M	10	CA
H53	90/99	abril	I	heces	H	PD	CA
H54	252/99	julio	IV	heces	M	30	CA
H55	274/99	julio	V	heces	H	23	CA
H56	304/99	agosto	IV	heces	M	0,08	CA
H57	342/99	agosto	IV	heces	M	PD	CA
H58	345/99	agosto	V	heces	H	44	CA
H59	379/99	septiembre	V	heces	M	0,5	CA
H60	66/00	marzo	I	heces	M	7	CA
H61	103/00	mayo	I	AB	M	77	CA ^a
H62	112/00	junio	I	heces	H	72	CA
H63	125/00	julio	I	heces	M	77	CA ^a
H64	165/00	julio	V	heces	H	55	CA
H65	226/00	julio	I	heces	M	89	CA
H66	618/00	diciembre	V	heces	M	33	CA
H67	(24/01)	enero	V	heces	M	80	CA
H68	39/01	febrero	I	heces	M	70	CA
H69	59/01	marzo	V	heces	M	79	CA
H70	102/01	abril	I	heces	M	35	CA
H71	103/01	abril	V	heces	M	NC	CA
H72	124/01	mayo	V	heces	H	0,9	CA
H73	183/01	junio	V	heces	H	1	CA
H74	185/01	junio	V	heces	M	4	CA
H75	336/01	agosto	V	heces	M	NC	CA
H76	428/01	septiembre	IV	heces	H	69	CA
H77	481/01	septiembre	IV	heces	M	29	CA ^b
H78	483/01	septiembre	IV	orina	M	29	CA ^b
H79	529/01	septiembre	VI	heces	H	41	CA
H80	215/02	junio	V	heces	M	34	CA
H81	278/02	julio	IV	heces	H	70	CA
H82	550/03	enero	IV	heces	H	12	CA
H83	23/04	enero	IV	heces	M	9	CA
H84	327/04	julio	I	heces	H	50	CA

a, aisladas de un mismo paciente con un intervalo de dos meses **b**, aisladas de un mismo paciente

NC, no consta CA, caso aislado AB, abceso 1 BF, brote familiar PD, pediátrica

Tabla I.b. Serotipo Brandenburg

Nº ref.	DATOS DEL AISLAMIENTO			DATOS DEL PACIENTE			CATEGORÍA EPIDEMIOLÓGICA
	Aisl./AÑO	MES	ÁREA PA	MUESTRA	SEXO	EDAD (años)	CA/BROTE
B1	493/93	noviembre	III	heces	H	1	CA ^a
B2	497/93	diciembre	III	heces	H	1	CA ^a
B3	8/95	enero	IV	heces	M	12	CA
B4	9/95	enero	IV	heces	M	54	CA
B5	24/95	enero	V	heces	M	18	CA
B6	190/95	junio	V	heces	H	2	CA
B7	202/95	junio	II	heces	H	4	CA
B8	203/95	junio	V	heces	M	NC	CA
B9	379/95	septiembre	III	heces	H	65	CA
B10	527/95	noviembre	IV	heces	M	4	CA
B11	579/95	diciembre	IV	AR			CA
B12	331/96	agosto	V	heces	M	2	CA
B13	19/97	febrero	III	heces	M	92	CA ^b
B14	20/97	febrero	III	heces	M	92	CA ^b
B15	136/97	junio	V	heces	M	NC	CA
B16	227/97	agosto	II	AB	H	56	CA
B17	338/97	octubre	V	heces	M	2	CA
B18	407/97	noviembre	V	heces	M	1	CA
B19	545/98	diciembre	V	heces	M	70	CA
B20	52/99	marzo	V	heces	H	7	CA
B21	26/00	febrero	IV	carne			CA
B22	385/00	septiembre	V	heces	M	NC	2 ND
B23	396/00	septiembre	V	heces	M	NC	2 ND
B24	422/00	septiembre	V	heces	M	NC	2 ND
B25	423/00	septiembre	V	heces	H	NC	2 ND
B26	483/00	septiembre	V	heces	M	66	2 ND
B27	484/00	septiembre	V	heces	H	NC	2 ND
B28	487/00	septiembre	V	heces	M	11	2 ND
B29	490/00	septiembre	V	heces	H	3	2 ND
B30	571/00	octubre	V	heces	M	42	2 ND
B31	145/01	junio	IV	heces	M	87	CA
B32	662/01	noviembre	IV	carne			CA
B33	37/02	enero	IV	heces	H	57	CA
B34	125/02	abril	IV	heces	M	1	CA
B35	272/02	junio	IV	heces	H	63	CA
B36	8/04	enero	V	heces	M	2	CA
B37	34/05	marzo	VIII	orina	H	2	CA

a, aisladas de un mismo paciente en dos meses sucesivos

b, aisladas de un mismo paciente

NC, no consta CA, caso aislado AR, agua residual AB, Abceso

2 ND, brote probablemente de tipo comunitario, oficialmente no registrado.

Tabla I.c. Serotipo Ohio

N° ref.	DATOS DEL AISLAMIENTO			DATOS DEL PACIENTE			CATEGORÍA EPIDEMIOLÓGICA
	Aisl./AÑO	MES	ÁREA PA	MUESTRA	SEXO	EDAD (años)	CA/BROTE
O1	811/91	octubre	III	heces	H	0,6	CA ^a
O2	852/91	noviembre	III	heces	H	0,7	CA ^a
O3	908/91	diciembre	III	heces	H	0,8	CA ^a
O4	011/92	enero	III	heces	H	0,9	CA ^a
O5	138/92	julio	III	heces	H	51	CA
O6	012/93	enero	III	heces	M	2,5	CA
O7	229/93	julio	IV	heces	H	46	CA
O8	264/93	julio	V	heces	M	NC	CA
O9	50/94	febrero	V	heces	H	42	CA
O10	139/94	mayo	IV	heces	M	0,8	CA
O11	309/94	agosto	III	heces	H	45	CA
O12	325/94	septiembre	III	heces	M	0,3	CA
O13	334/94	septiembre	III	heces	M	3	CA
O14	336/94	septiembre	III	heces	M	2	CA
O15	386/94	octubre	I	heces	H	NC	CA
O16	461/94	noviembre	VII	AR	-	-	CA
O17	127/95	mayo	V	heces	H	0,1	3 BF/3 ^b
O18	170/95	mayo	V	heces	H	1	3 BF/3
O19	302/95	agosto	V	heces	H	0,4	3 BF/3 ^b
O20	489/95	noviembre	VIII	heces	M	85	CA
O21	570/95	diciembre	I	heces	H	4	CA
O22	131/96	mayo	V	heces	H	NC	CA
O23	199/96	junio	V	heces	M	NC	CA
O24	557/96	agosto	IV	heces	M	67	CA
O25	34/98	febrero	V	heces	M	0,7	CA ^c
O26	72/98	marzo	V	heces	M	0,8	CA ^c
O27	74/98	marzo	V	heces	H	1	CA
O28	75/98	marzo	V	heces	M	53	CA
O29	90/98	marzo	IV	heces	M	0,5	CA
O30	163/98	junio	V	heces	H	PD	CA
O31	191/98	junio	V	heces	M	2	CA
O32	209/98	junio	IV	heces	H	0,9	CA
O33	267/98	agosto	III	heces	H	0,6	CA
O34	358/00	agosto	IV	heces	H	0,1	CA
O35	26/01	febrero	IV	heces	H	1	CA
O36	301/01	agosto	IV	heces	H	13	CA
O37	592/01	septiembre	VI	heces	H	41	CA
O38	68/02	febrero	IV	heces	M	2	CA
O39	148/02	abril	IV	heces	M	1,4	CA
O40	408/02	junio	IV	heces	M	NC	CA
O41	6/03	enero	V	heces	H	30	4 ND
O42	7/03	enero	IV	heces	M	NC	4 ND
O43	9/03	enero	II	heces	H	29	4 ND

Tabla I.c. Serotipo Ohio (continuación)

Nº ref.	DATOS DEL AISLAMIENTO			DATOS DEL PACIENTE			CATEGORÍA EPIDEMIOLÓGICA
	Aisl./AÑO	MES	ÁREA PA	MUESTRA	SEXO	EDAD (años)	CA/BROTE
O44	10/03	enero	II	heces	H	2	4 ND
O45	14/03	enero	IV	heces	H	80	CA
O46	19/03	enero	V	heces	M	3	4 ND
O47	20/03	enero	V	heces	H	25	4 ND
O48	21/03	enero	V	heces	M	74	4 ND
O49	26/03	enero	VI	heces	M	6	4 ND
O50	27/03	enero	VI	heces	M	74	4 ND
O51	40/03	enero	VI	heces	M	13	4 ND
O52	135/03	enero	V	heces	M	69	4 ND
O53	550/03	agosto	IV	heces	H	12	CA
O54	705/03	agosto	V	heces	M	63	CA
O55	290/05	septiembre	IV	heces	H	1	CA

a, aisladas de un mismo paciente en cuatro meses sucesivos

b, aisladas de un mismo paciente con un intervalo de tres meses

c, aislamientos del mismo paciente en dos meses consecutivos

AR, agua residual NC, no consta CA, caso aislado

3 BF, brote familiar 4 ND, brote probablemente de tipo comunitario, oficialmente no registrado.

PD, pediátrica

Anexo II. Oligonucleótidos empleados en este trabajo

Tabla II.a. Genes de resistencia a antimicrobianos

Familia	Mecanismo de acción o proteína	Antibiótico/ Iniciadores	Secuencia 5'-3'	T _m	Amplificación (pb)	Referencia
β-lactámicos	carbencilasa	AP-CB/ <i>pse-1</i>	CGCTTCCCCTTAACAAGTAC/ CTGGTTCATTTAGATAGCG	65	419	Sandvang <i>et al.</i> , 1997
	oxacililasa	AP-OX/ <i>oxa-1</i> like	AGCAGCGCCAGTGCATCA/ ATTCGACCCCAAGTTTCC	60	708	Guerra <i>et al.</i> , 2000a
	β-lactamasa	AP/ <i>tem</i>	TTGGGTGCACGAGTGGGT/ TAATTTGTGCCGGGAAGC	55	503	Arlet y Phillippon, 1991
Aminoglicósidos	N-acetil transferasa	GM-NN-KN/ <i>aac(3)-II</i>	ATTCGAAAACCTCGGAGTC/ CGGAGTGGCTCCGAAGTG	55	800	Guerra/ (X51534)
	N-acetil transferasa	GM-NN-KN/ <i>aac(3)-IV</i>	GTTACACCGGACCTTGGGA/ AACCGCATTGAGCGTCAG	55	675	Guerra <i>et al.</i> , 2001
	O-fosfotransferasa	KM/ <i>aphAI-IAB</i>	AAACGTCTTGCTCGAGGC/ CAAACCGTTATTCATTCGTGA	55	500	Frana <i>et al.</i> , 2001
	O-fosfotransferasa	S/ <i>strA4F</i> / 2R	AAAATCGCACCTGCTTCCC/ CCAATCGCAGATAGAAGGC	60	669	Este trabajo (AL513383) Madsen <i>et al.</i> , 2000
	O-fosfotransferasa	S/ <i>strB3F/3R</i>	ATCGTCAAGGGATTGAAACC/ GGATCGTAGAACATATTTGGC	60	509	Madsen <i>et al.</i> , 2000
	O-adeniltransferasa	S-SP/ <i>aadA</i>	GTGGATGGCGGCTGAAGCC/ ATTGCCAGTCGGCAGCG	70	526	Sandvang <i>et al.</i> , 1997
Inhibidores del folato	DHFR-Ia reductasa	TP/ <i>dhfrA1</i> -like	GTGAAACTATCTACTAATGG/ CCCTTTTGCCAGATTGG	55	473	Guerra <i>et al.</i> , 2000a
	DHFR-XII reductasa	TP/ <i>dhfrA12</i>	ACTCGGAATCAGTACGCA/ GTGTACGGAAATACAGCT	55	462	Guerra <i>et al.</i> , 2001
	DHPS-I sintetasa	SD/ <i>sul1</i>	CTTCGATGAGAGCCGGCGGC/ GCAAGGCGGAAACCCGCGCC	65	436	Sandvang <i>et al.</i> , 1997
	DHPS-II sintetasa	SD/ <i>sulII</i>	TCAACATAACCTCGGACAGT/ GATGAAGTCAGCTCCACCT	55	707	Chu <i>et al.</i> , 2001
	DHPS-III sintetasa	SD/ <i>sul3</i>	GAGCAAGATTTTGGAAATCG/CATC TGCAGCTAACCTAGGGCTTTGGA	50	700	Perreten y Boerlin, 2003
Cloranfenicol	CHL-acetiltransferasa	CM/ <i>cata</i>	CCACCGTTGATATATCCC/ CCTGCCACTCATCGCAGT	60	623	Guerra <i>et al.</i> , 2001
	Prot. Exportadora CML	CM/ <i>cmlA</i>	TGTCATTTACGGCATACTCG/ ATCAGGCATCCCATTTCCCAT	55	435	Guerra <i>et al.</i> , 2001
	Prot. Exportadora FLO	CM-FLOR/ <i>flo-R</i>	CACGTTGAGCCTCTATAT/ ATGCAGAAGTAGAACGCG	55	868	Ng <i>et al.</i> , 1999
Tetraciclinas	Prot. Exportadora TET-A	Tc/ <i>tet(A)</i>	GCTACATCTGCTTGCTT/ CATAGATCGCCGTGAAGA	55	210	Ng <i>et al.</i> , 1999
	Prot. Exportadora TET-B	Tc/ <i>tet(B)</i>	TTGGTTAGGGCAAGTTTTG/ GTAATGGGCCAATAATACCG	55	659	Ng <i>et al.</i> , 1999
	Prot. Exportadora TET-G	Tc/ <i>tet(G)</i>	GCTCGGTGGTATCTCTGC/ AGCAACAGAATCGGGAAC	55	500	Ng <i>et al.</i> , 1999
Quinolonas	ADN-girasa subunidad A	NAL/fluorq. <i>gyrA</i>	AAATCTGCCGTGTCGTTGGT/ GCCATACCTACGGCGATACC	55	343	Vila <i>et al.</i> , 1995
	ADN-girasa subunidad B	NAL/fluorq. <i>gyrB</i>	CTCTCCCAGACCAAGACA/ TCACGACCGATACCACAGCC	55	447	Vila <i>et al.</i> , 1994
	Topoisomerasa IV subunidad C	NAL/fluorq. <i>parC</i>	AAACCTGTTTCAGCGCCGATT/ GTGGTGCCTTAAGCAAA	55	291	Vila <i>et al.</i> , 1995

Tabla II.b. Integrones y transposones

EGM	Función (gen)	Iniciadores	Secuencia 5'-3'	T _m	Amplicón (pb)	Referencia
	Integrasas genéricas (<i>intI</i>)	Hep-35/36	TGCGGGTYAARGATBTKGATTT/ CARCACATGCGTRTARAT	55	491	White <i>et al.</i> , 2001
Integron clase 2	Región variable	Hep-74/51	CGGGATCCCGGACGGCATGCACGATTTGT A/GATGCCATCGCAAGTACGAG	55	variable	White <i>et al.</i> , 2001
Integron de clase 1	Región variable	5'CS/3'CS	GGCATCCAAGCAGCAAG/ AAGCAGACTTGACCTGA	55	variable	Lévesque <i>et al.</i> , 1995
	Integrasa 1 (<i>intI1</i>)	IntI1-F/B	GCCTTGCTGTCTTCTAC/ GATGCCTGCTTGTCTAC	55	558	Ng <i>et al.</i> , 1999
	R-Amonio cuaternario (<i>qacEΔ1</i>)	QacEΔ1-F/B	ATCGCAATAGTTGGCGAAGT/ CAAGCTTTTGCCCATGAAGC	60	226	Sandvang <i>et al.</i> , 1997
	ORF (<i>orf5</i>)	orf5-F/B	ATGCACGACGCTGCGCGTGGATG/ CAGCCGGGATTGAAAGTTCGACG	60	388	Martín/ (AF071413)
	(<i>tniBΔ1</i>)	tniB-F2/B	GCGCCACGCCCACGGTTGCCGG/ GGCCGGCGCAGCGGGAGCGAAGC	60	333	Martín / (AF071413)
	(<i>tniA</i>)	tniA-F/B	GATCTCCGGCGCACGCTGACCC/ AATCTGGTCGAACGGTTGGCGG	60	480	Rodríguez <i>et al.</i> , 2006a
	(<i>istA</i>)	istA-F/B	GACAGCGTTGGCAAGTTAAGTCC/ GGCATGCCAGTGGGCATCAAACA	60	404	Rodríguez <i>et al.</i> , 2006a
	(<i>istB</i>)	istB-F/B	TGGCATGGCACACGCCATTGAGG/ CAATGGCTGTGGCCAGGTGAGTC	60	307	Martín/ (AF071413)
	(<i>orfAB</i>)	orfAB-F/B	TCGATTACTTGGCAAAGTGCCCC/ CTGTCCGAATGGATAACCGGATG	60	783	Martín/ (AF071413)
Tn3	Transposasa (<i>tnpA</i>)	tn3-F/B	GTGCTGACTGGCAGGCAAATCGG/ GCCTGAAAATCAACCAAGTCTGGC	60	532	Rodríguez <i>et al.</i> , 2006c
Tn9	región Is1	Is1a-F/B	CTGACGGGGTGGTGCCTAACGGC/ GTA AACAGCCAGCGCTGGCGCG	65	337	Rodríguez <i>et al.</i> , 2006a
Tn10	region Is10	Is10-1	CTGATGAATCCCCTAATG	55	9148	Schnabel y Jones, 1999
	Transposasa (<i>tnp</i>)	Is10-F/R2	CTACCGAGTAACACCACCCGCTC/ AGCATCAGGGCGATTAGCAGC	60	536	Este trabajo (AP005147)
	(<i>tetD</i>)	tetD-F/R	ATGTGGCGAATAAAGCGGGT/ CAAACGACGAGCACGAATATAGC	60	108	Este trabajo (AP005147)
	(<i>tetC</i>)	tetC-F/R	ATGCCTACATCACAACAAAACCTGA/ TGCTGACAATGGCGTTACCT	60	210	Este trabajo (AP005147)
	(<i>ybdA</i>)	ybdA-F	CGTACATGCCAAAGTTCCACG	60	*a	Este trabajo (AP005147)
	(<i>ybfA</i>)	ybfA-F	TTGCTGCTTTGTACCTTC	60	*b	Este trabajo (AP005147)
	Represor <i>tetB</i> (<i>tetR</i>)	tetR-F/R	ACAACCCGTAACCTCGCC/ TTCCAATACGCAACCTAAAG	55	366	Morsczeck <i>et al.</i> , 2004

B = G+T+C K = G+T R = A+G Y = C+T

* Utilizado conjuntamente con: a) Is10-F; b) tetR-F

Tabla II.b. Integrones y transposones (continuación)

EGM	Función (gen)	Iniciadores	Secuencia 5'-3'	T _m	Amplicón (pb)	Referencia
Transposon Tn21	Transposasa (<i>tnpA</i>)	TnpA-F/B	AGAAAGTTCGTCCTGGGCTG/ GGCCAAGGACAAGAACCTGT	60	317	Dahlberg y Hermansson, 1995
	Transposasa (<i>tnpA</i>)	TnpA R100-F	GATCGGCGCGGGGAAGTTCAGGC	60	*a	Rodríguez <i>et al.</i> , 2006a
	Transposasa (<i>tnpA</i>)	TnpA R100-R	AGCCGGTTGCAGAGGCCGTAGC	60	3157	Rodríguez <i>et al.</i> , 2006a
	Resolvasa (<i>tnpR</i>)	TnpR R100-F	GAGCGTCAGCGGAGGGTATTG			
	Resolvasa (<i>tnpR</i>)	TnpR-F/B	GGCGACACCGTGGTGGTCATAGC/ CGGTAAGCCCCGCGTTGCTTGGC	60	257	Guerra <i>et al.</i> , 2002
	(<i>tnpM</i>)	TnpM-F/B	TGGAAACACCCGACTGCCTTGCG/ CGGCGGCGAATCACAAAGCGTCCG	60	318	Martín/ (AF071413)
		urf2-F/B	GGAGATCGAAGTACCGAATCGG/ CAGGAGCTGGCTGCACAACAGC	65	321	Rodríguez <i>et al.</i> , 2006a
		merE-F/B	CGCCCCTGACAACTGCCGCC/ CGAGCGGGCAACACCCAATG	60	166	Rodríguez <i>et al.</i> , 2006a
		merD-F/B	TACGGCCGGTGGCTGCACCACG/ CGCTCGGCTGGCATGGAGGCCAG	60	252	Rodríguez <i>et al.</i> , 2006a
		merA-F2/B2	AAGGCGCACGTGTCACGCTGATC/ CCGCTGCCTTCTCAACCACCAG	70	1238	Rodríguez <i>et al.</i> , 2006a
	Operon Mer	merC-F/B	AGCGTCGTTCCGCGATGGGCTG/ CCGGTCCGCAACGGCGATGCGCC	60	346	Rodríguez <i>et al.</i> , 2006a
		merP-F/B	CTCCCTTGGCCTCGCCGCGCTG/ GGACGGATAGCCGGCTCTGCGG	65	221	Rodríguez <i>et al.</i> , 2006a
		merT-F2/B	CGCTAGTACTGGTCCGCTGGGC/ GAAATCCAAGCGCAGCAGGAC	60	242	Rodríguez <i>et al.</i> , 2006a
	merR-F/B	GGGGTCAACGTGGAGACAATCCG/ CCTTGAGCTTGTGTTCCGCCAGG	65	233	Rodríguez <i>et al.</i> , 2006a	
Transposon Tn1721	ORF (<i>orf1</i>)	orf1721-F/R2	ATTTACCAGTACGGGTCG/ TGCTCAGGTTCAAGGCTTGGT	60	355	Este trabajo (X61367)
	Resolvasa (<i>tnpR</i>)	LAF/LAR	GTTCGGGTCAGCAGCTTTGAC/ GAGGGTTTCCCGGCTGATGT	60	510	Pezzella <i>et al.</i> , 2004
	Transposasa (<i>tnpA</i>)	tnpA1721-F/R	AGCTCTGCCTGCTGCGCTAC/ ATGTGTCCAGCATGTGCCG	60	520	Este trabajo (X61367)
		tnpA1721-F2/R2	ACTGGCTGCAAAGTGTGAA/ TCCGTAAGGGCCGAAACTTC	60	360	Este trabajo (X61367)
	Represor <i>tetA</i> (<i>tetR</i>)	tetR1721-F3/R3	TAGACGGTCTGACGACACG/ TCTCGGTCCTTCAACGTTT	60	572	Este trabajo (X61367)
	Represor <i>tetA</i> (<i>tetR</i>)	tetR1721-F4/R3	TGACAATCAGCTACTTACTGTTG/ TCTCGGTCCTTCAACGTTT	60	233	Este trabajo (X61367)
	<i>tet(A)</i> 1721	tetA-F tetAR-3	GCTACATCCTGCTTGCCCT GGCATAGGCCATATCGTTTCCA	60	336	Ng <i>et al.</i> , 1999 Hartman <i>et al.</i> , 2003
	región intergenica	1721-F	TCGTAGCAGCAGTCTGGAC	60	*b	Este trabajo (X61367)
	región intergénica	1721-R	CGCCAAATCTCACCGTATCTCCC	60	*c	Este trabajo (X61367)

* Utilizado conjuntamente con: a) cat-F; b) tnpA1721-R2; c) tetA-F.

Tabla II.c. Genes de virulencia

Gen	Función/ localización	Iniciadores	Secuencia 5'-3'	T _m	Amplicón (pb)	Referencia
<i>phoP/Q</i>	regulación transcripción / cromosoma	Pho P1/P2	ATGCAAAGCCCGACCATGACG/ GTATCGACCACCACGATGGTT	60	299	Way <i>et al.</i> , 1993
<i>stn</i>	enterotoxina/ cromosoma	Stn-1/2	TTGTCTCGCTATCACTGGCAACC/ AAACTGGACCACGGTACAA	60	617	Prager <i>et al.</i> , 1995
<i>hin/H2</i>	variación fase/ cromosoma	1750-L/R	CTAGTGCAAATTTGTGACCGCA/ CCCATCGCGCTACTGGTATC	60	236	Way <i>et al.</i> , 1993
<i>IroB</i>	captación Fe/ cromosoma	IRO-1/2	TGCGTATTCTGTTTTGTCGGTCC/ TACGTTCCACCATTCTTCCC	60	606	Bäumler <i>et al.</i> , 1997a
<i>himA</i>	replicación, recombinación y regulación/ cromosoma	SHIMA-L/R	CGTGCTAACGCTCGCCTGTAT/ AGAGGTGGACGGGTTGTGCCGTT	60	122	Bej <i>et al.</i> , 1994
<i>agfA</i>	fimbria agregativa/ cromosoma	TAF-3/4	TCCGGCCCCGGACTCAACG/ CAGCGCGCGTTATACCG	60	261	Doran <i>et al.</i> , 1993
<i>slyA</i>	supervivencia en macrófagos / cromosoma	SLYA-1/2	GCCAAAAGTGAAGCTACAGGTG/ CGGCAGGTCAGCGTGTCTGTG	60	700	Guerra <i>et al.</i> , 2000b
<i>spvC</i>	invasividad/ plásmido	SpvC-F/B	ACTCCTTGCAACCAAAATGCGGA/ TGCTTCTGCATTTCGCCACCATCA	60	566	Chiu y Ou 1996
<i>rck</i>	resistencia sérica/ plásmido	rck F/B	TCGTTCTGTCCCTCACTGC/ TCATAGCCCAGATCGATG	60	474	Guerra <i>et al.</i> , 2002
<i>pefA</i>	fimbrias/plásmido	pefA-F/B	GCACACGCTGCCAATGAA/ CACAGACTTGAAGTCACC	60	442	Guerra <i>et al.</i> , 2002
<i>pefB</i>	fimbrias/plásmido	pefB-F/B	CACAGACTTGAAGTCACC/ TGATGCGTGACAGGCGGTTC	55	110	Herrero <i>et al.</i> , 2006
<i>pefC</i>	fimbrias/plásmido	pefC-F/B	AAGAATCAGCAAATGCCCTGTG/ GCGAATTCTAAAGGAGAGCGACGTG	60	1403	Bäumler <i>et al.</i> , 1996b
<i>pefD</i>	fimbrias/plásmido	pefD-F/B	CTTTAAGGTGAGGCCAAGG/ TCCGTTGAGCGACAGTTTCC	55	403	Herrero <i>et al.</i> , 2006
<i>sefD</i>	fimbrias/ cromosoma	sefD-F/B	TCAAATTTAAAGCACAAAGAAC/ TTATAATTCAAATTTCTGTGCG	50	374	Bäumler <i>et al.</i> , 1997b
<i>sodC1</i>	resistencia Oxid./ cromosoma	sodC1-F/B	CCAGTGGAGCAGGTTTATCG/ GGTGCCTCATCAGTTGTTC	55	460	Herrero <i>et al.</i> , 2006
<i>sopE</i>	efector SPII/ cromosoma	sopE-F/B	CAGACCCGTGAAGCTATACT/ AATTGCTGTGGAGTCGGCAT	55	347	Pasmans <i>et al.</i> , 2003
<i>sopE2</i>	efector SPII/ cromosoma	sopE2-F/B	CAGACATGCGAAGCCATATT/ AATTGTTGTGGCGTTGGCAT	55	347	Este trabajo (AE008782)
<i>ast</i>	Toxina EAST1	EAST1a/b	CCATCAACACAGTATAT/ GGTCGCGAGTGACGGCTTTGT	55	111	Paiva de Sousa y Dubreuil, 2001

Las referencias de los genes se indican en el apartado IV.2.b.

Tabla II.c. Genes de virulencia (*continuación*)

Gen	Función/ localización	Iniciadores	Secuencia 5'-3'	T _m	Amplicón (pb)	Referencia
<i>invE/A</i>	SPI 1/cromosoma	Sal-1/2	TGCCTACAAGCATGAAATGG/ AAACTGGACCACGGTGACAA	60	500	Stone <i>et al.</i> , 1994
<i>orgA</i>	SPI 1/cromosoma	orgA-F/B	GATAAGGGCAAATCGTCAAATG/ GTAAGGCCAGTAGCAAATTTG	60	540	Soto <i>et al.</i> , 2006
<i>ttrC</i>	SPI 2/cromosoma	ttrC-F/B	GTGGGCGGTACAATATTTCTTTT/ TCACGAATAATAATCAGTAGCGC	60	920	Soto <i>et al.</i> , 2006
<i>ssaQ</i>	SPI 2/cromosoma	ssaQ-F/B	GAATAGCGAATGAAGAGCGTCC/ CATCGTGTATCCTCTGTCAGC	60	677	Soto <i>et al.</i> , 2006
<i>sugR</i>	SPI 3/cromosoma	sugR-F/B	GCTCGACAAGCGAGGAGAAC/ CGCTGGTATTGACGCCAGAC	60	850	Este trabajo (AF106566)
<i>rhuM</i>	SPI 3/cromosoma	rhuM-F/B	TGGAGCGTATCCGCGATATTC/ AACCGCGATATCCTTCTCAC	60	546	Este trabajo (AF106566)
<i>rmbA</i>	SPI 3/cromosoma	rmbA-F/B	TTTCCTGACAGCGCAGTACGG/ CCGGTAAACAAGCGGTGCATC	60	359	Este trabajo (AF106566)
<i>misL</i>	SPI 3/cromosoma	misL-F/B	GACGTTGATAGTCTGCCATCCAG/ CAATGCCCCAGTCTCCGTGC	60	986	Soto <i>et al.</i> , 2006
<i>mgtC</i>	SPI 3/cromosoma	mgtC-F/B	TGACTATCAATGCTCCAGTGAAT/ ATTTACTGGCCGCTATGCTGTTG	60	655	Soto <i>et al.</i> , 2006
<i>spi4R</i>	SPI 4/cromosoma	spi4R-F/B	GATATTTATCAGTCTATAACAGC/ ATTCTCATCCAGATTTGATGTTG	60	1269	Soto <i>et al.</i> , 2006
<i>spi4D</i>	SPI 4/cromosoma	spi4D-F/B	GAATAGAAGACAAAGCGATCATC/ GCTTTGTCCACGCCCTTTCATC	60	1231	Soto <i>et al.</i> , 2006
<i>sopB</i>	SPI 5/cromosoma	sopB-F/B	GATGTGATTAATGAAGAAATGCC/ GCAAACCATAAAAACACTACTCA	60	1170	Soto <i>et al.</i> , 2006
<i>pipA</i>	SPI 5/cromosoma	pipA-2F/2B	GATATTTCCGAACATGCACCAAAC/ TAGACCATTCTGGGAGGTGAAGG	60	575	Este trabajo (AE008747)

Las referencias de los genes se indican en el apartado IV.2.b.

Tabla II.d. Amplificación de secuencias aleatorias

Técnica	Iniciador	Secuencia 5'-3'	T _m	Amplicón (pb)	Referencia
RAPD	S	TCACGATGCA	35	Variable	Williams <i>et al.</i> , 1990
	C (OPB-17)	AGGGAACGAG	35	Variable	Lin <i>et al.</i> , 1996

Anexo III. Combinaciones de oligonucleótidos empleadas para el análisis de la estructura de los distintos transposones

Tabla III.a. Transposón Tn10

Fragmento	Iniciadores	Posición (AP005147)		Amplicón (pb)	Genes			
<i>is10-tnpR</i>	is10-1-is10R2	1	1090	1090	<i>tnpR</i>			
<i>is10-tnpL</i>	is10-1-is10R2	9148	8059	1090	<i>tnpL</i>			
<i>tetB-tetR</i>	tetBr-tetRr	4263	2688	1576	<i>tet(B)</i>	<i>tetR</i>		
<i>tetR-YbdA</i>	tetRf-ybdAf	3898	4804	907	<i>tetR</i>	<i>ybdA</i>		
<i>ybfA-tnpL</i>	ybfAf-is10f	7220	8594	1375	<i>ybdAf</i>	<i>tnpL</i>		
<i>is10-tet(B)</i>	is10-1-tetBd	1	3346	3346	<i>tnpR</i>	<i>tetD</i>	<i>tetC</i>	<i>tet(B)</i>
<i>tnpR-tet(B)</i>	is10d-tetBd	555	3346	2792	<i>tnpR</i>	<i>tetD</i>	<i>tetC</i>	<i>tet(B)</i>
<i>tnpR-tetD</i>	is10f-tetDf	555	1597	1043	<i>tnpR</i>	<i>tetD</i>		
<i>tetD-tetC</i>	tetDr-tetCr	1490	2247	758	<i>tetD</i>	<i>tetC</i>		
<i>tetC-tet(B)</i>	tetCf-tetBf	2047	3346	1300	<i>tetC</i>	<i>tet(B)</i>		

Tabla III.b. Transposón Tn1721

Fragmento	Iniciadores	Posición (X61367)		Amplicón (pb)	Genes			
<i>orf1-tnpR</i>	orf1R2-LAR	1403	2610	1208	<i>orf1</i>	<i>tnpR</i>		
<i>tnpR-tnpA</i>	LAF-tnpAr	2101	3320	1220	<i>tnpR</i>	<i>tnpA</i>		
<i>tnpA</i>	tnpAf-tnpAr2	2801	5590	2790	<i>tnpA</i>	<i>tnpA'</i>		
<i>tnpA-tetR</i>	tnpAf2-tetRf4	5231	6185	955	<i>tnpA'</i>	<i>tetR</i>		
<i>tnpA-tet(A)</i>	tnpAd2-tetAr	5231	7771	2541	<i>tnpA'</i>	<i>tetR</i>	<i>tet(A)</i>	
<i>tnpA-tetA3</i>	tnpAd2-tetA3r	5231	7897	2667	<i>tnpA'</i>	<i>tetR</i>	<i>tet(A)</i>	<i>tetA3</i>
<i>tetR-tetA3</i>	tetRr3-tetA3r	5953	7897	1945	<i>tetR</i>	<i>tet(A)</i>	<i>tetA3</i>	
<i>tet(A)-intergen</i>	tetAF-1721R	7562	9287	1726	<i>tet(A)</i>	<i>tetA3</i>		
<i>intergen-ΔtnpA</i>	1721F-tnpAr2	9021	11098	2078	<i>tnpA'</i>			

Tabla III.c. Transposición Tn21

Fragmento	Iniciadores	Posición (AF071413)		Amplicón (pb)	Genes
<i>tnpR-tnpA</i>	tnpR-R100F-tnpA-R100R	3194	37	3157	<i>tnpA</i>
<i>intI1-tnpR</i>	int1d-tnpRr	5003	3145	1859	<i>intI1</i> <i>tnpM</i> <i>tnpR</i>
<i>dfrA1-intI1</i>	dfrAr-int1r	*	4446	1600	<i>intI1</i> <i>dfrA1</i>
RV	3CS-5CS	*	*	1600	<i>aadA1</i> <i>dfrA1</i>
<i>aadA1-orf5</i>	aadAd-orf5r	5514	8124	2611	<i>aadA1</i> <i>qac</i> <i>sulI</i> <i>orf5</i>
<i>orf5-tniA</i>	orf5d-tniAd	7736	13711	5976	<i>orf5</i> <i>istB</i> <i>istA</i> <i>orfAB</i> <i>tniB</i> <i>tniA</i>
<i>tniA-urf2</i>	tniAr-urfd	13231	15294	2064	<i>tniA</i> <i>urf2</i>
<i>urf2-merE</i>	urfr-merEd	15062	15887	826	<i>urf2</i> <i>merE</i>
<i>merE-merD</i>	mrEr-merDd	15742	16187	446	<i>merE</i> <i>merD</i>
<i>merD-merA</i>	merDr-merAd	15935	17597	1663	<i>merD</i> <i>merA</i>
<i>merA-merC</i>	merAr-merCd	16360	18413	2054	<i>merA</i> <i>merC</i>
<i>merC-merR</i>	merCr-merRr	18063	19465	1403	<i>merC</i> <i>merP</i> <i>merT</i> <i>merR</i>

*No se indica la posición de los cebadores al no estar el gen *dfr1* en la secuencia que se usó como modelo del Tn21.

En negrita se indican los tamaños de los amplicones visualizados, al no saberse el tamaño esperado.

Tabla III.d. Transposición Tn9 y unión al Tn21 (Tn2670)

Fragmento	Iniciadores	Posición (V00622)		Amplicón (pb)	Genes
<i>IS1-catA1</i>	is1r-catr	337	1641	1305	<i>IS1</i> <i>catA1</i>
<i>catA1-tnpA</i>	catd-tnpA-R100F	1018	*	800	<i>catA1</i>
<i>merR- IS1</i>	merRd-is1d	19256	*	1200	<i>merR</i> <i>IS1</i>

*No se indica la posición de los cebadores al no encontrarse la secuencia anclada del Tn2670 en la base de datos.

En negrita se indican los tamaños de los amplicones visualizados, al no conocerse el tamaño esperado.

